

Morfogenesi e regolazione

- 1) Lo sviluppo evolutivo di una struttura o parte di un organismo
- 2) Lo sviluppo embrionario di una struttura o parte di un organismo
- 3) Il processo in un complesso sistema-ambiente che elabora la sua forma o struttura.
Esempi: crescita, apprendimento e sviluppo di una società.

Un sistema morfogenetico è capace di mantenere la sua continuità e integrità cambiando aspetti essenziali della sua struttura o organizzazione.

Regolazione (regulation). Una delle proprietà più importanti e elusive dei organismi viventi è la capacità di regolare forma e grandezza. (ad esempio la testa cresce di meno, le orecchie raggiungono la loro grandezza finale a 5-6 anni).

Alcuni aspetti cellulari della morfogenesi sono stati elucidati, e aspetti molecolari sono l'argomento di studio. Quello che manca è una visione globale, che unisce il molecolare con il macro molecolare. Abbiamo le risposte a "come?", ma non a "perché?"

Fertilization begins when a sperm penetrates an oocyte (an egg) and it ends with the creation of the **zygote**.

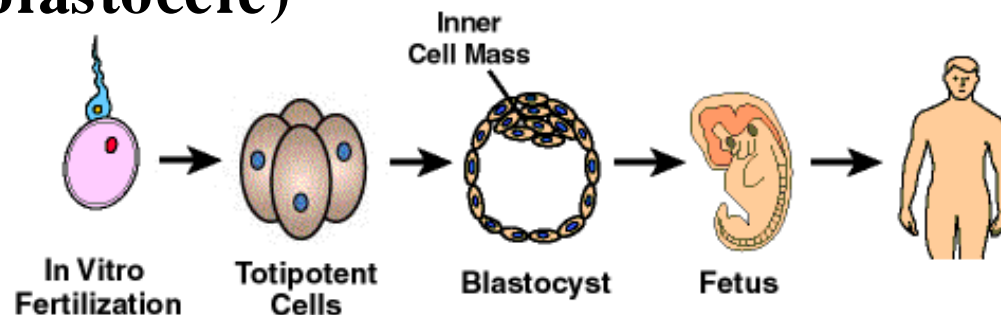
The early process of cell division is **Cleavage**

The First Cell Divisions produce **Blastomeres**, undifferentiated cells, each one is totipotent

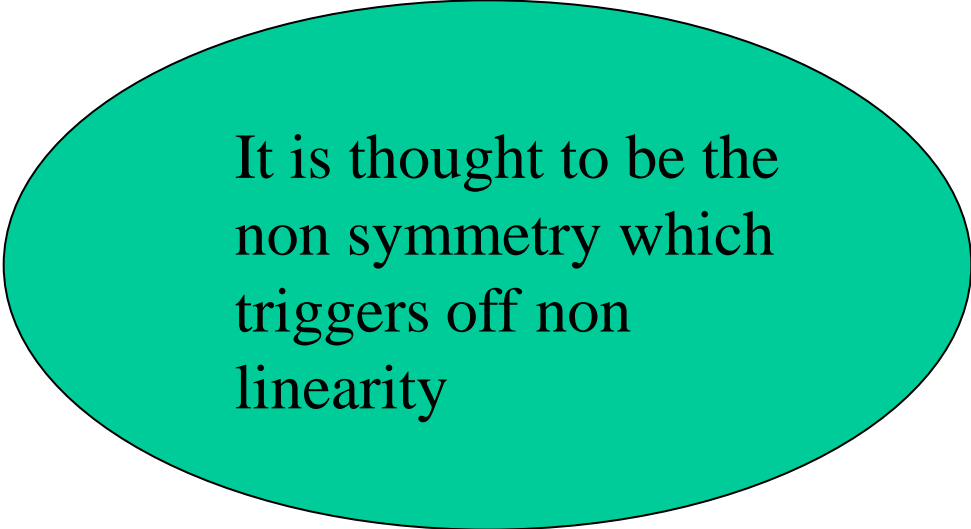
After about sixteen cells (and how many divisions?), the zygote becomes a **morula** (mulberry shaped) .

At this stage it is called a blastocyst. This is the first stage of morphogenesis.

The presence of the blastocyst indicates that two cell types are forming: the **embryoblast** (inner cell mass on the inside of the blastocele (inner cavity), and the **trophoblast** (the cells on the outside of the blastocele)



Zygote: not symmetrical (why?) - POLARITY.
Almost all have an ANIMAL pole (nr nucleus) and a
VEGETAL pole (far from nucleus)



It is thought to be the
non symmetry which
triggers off non
linearity

Fertilization begins when a sperm penetrates an oocyte (an egg) and it ends with the creation of the **zygote**. (see next slide)

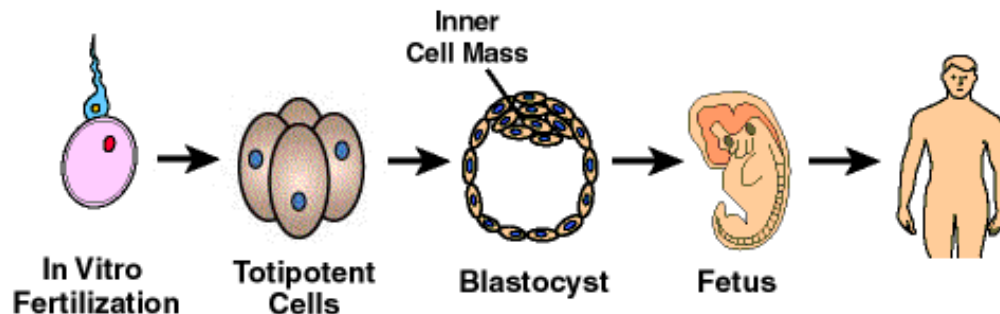
The early process of cell division is **Cleavage**

The First Cell Divisions produce **Blastomeres**, undifferentiated cells, each one is totipotent

After about sixteen cells (and how many divisions?), the zygote becomes a **morula** (mulberry shaped) .

At this stage it is called a blastocyst. This is the first stage of morphogenesis.

The presence of the blastocyst indicates that two cell types are forming: the **embryoblast** (inner cell mass on the inside of the blastocele(inner cavity), and the **trophoblast** (the cells on the outside of the blastocele)



The trophoblast forms the placenta

The inner cell mass or embryoblast: the fetus

The blastocyst is pluripotent, or what we call **embryonic stem cells**. (see stem cells)

What's happening? The fertile egg is symmetrical. Each step leads to a greater level of asymmetry.

This is what we call morphogenesis. →

The development of form and function.

The next step is called Gastrulation : a crucial time in the development of multicellular animals.

*"It is not birth, marriage, or death, but **gastrulation**, which is truly the most important time in your life."*

Lewis Wolpert (1986)

During gastrulation, the 3 germ layers of an embryo are formed and the body plan of the mature organism is established. Movements on a massive scale allow cells to establish great complexity from a very simple starting form .

1. The three primary germ layers (ectoderm, mesoderm & endoderm) are established.
2. The basic body plan is established, including the physical construction of the rudimentary primary body axes.
3. As a result of the movements of gastrulation, cells are brought into new positions, allowing them to interact with cells that were initially not near them.

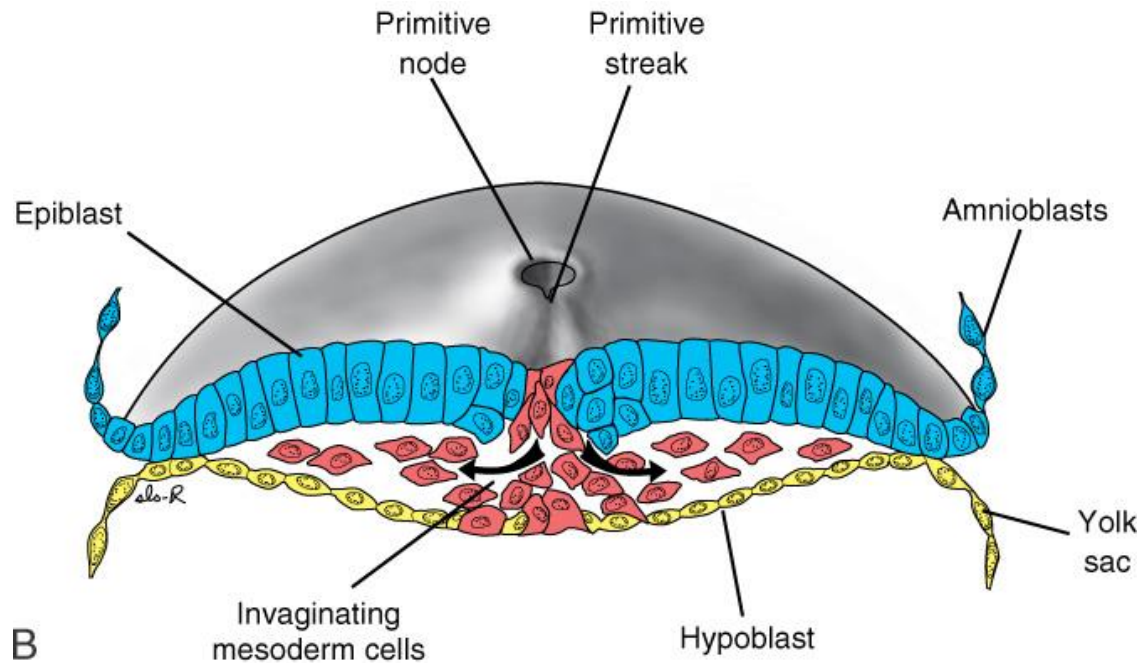
Endoderm: the most internal germ layer, forms the lining of the gut and other internal organs.

Ectoderm, the most exterior germ layer, forms skin, brain, the nervous system, and other external tissues.

Mesoderm, the the middle germ layer, forms muscle, the skeletal system, and the circulatory system.

There are two major types of cell arrangements in the embryo: **epithelial cells**, which are tightly connected to one another in sheets or tubes, and **mesenchymal cells**, which are unconnected to one another and which operate as independent units. **Morphogenesis is brought about through a limited repertoire of variations in cellular processes within these two types of arrangements: (1) the direction and number of cell divisions; (2) cell shape changes; (3) cell movement; (4) cell growth; (5) cell death; and (6) changes in the composition of the cell membrane or secreted products**

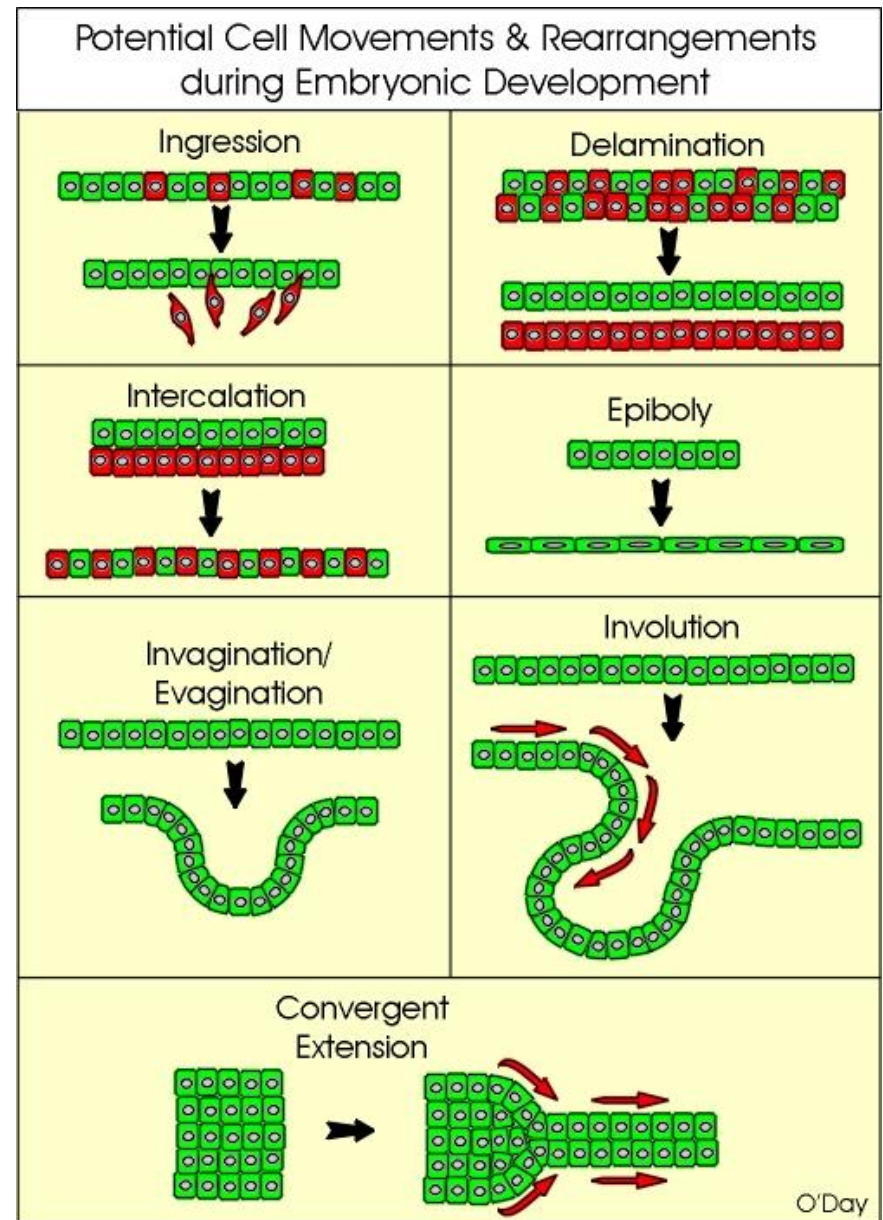
How it starts: at around 9 days, the inner cell mass (or embryoblast) divides into 2 layers, epiblast and hypoblast. The epiblasts migrate and invaginate to form an intermediate layer (later the mesoderm). This process is correlated with changes in cell-cell adhesion through the *downregulation of cadherins and IgCAMs*.



So, even at 9 days, cell cell and cell ecm interaction is critical.

The movements characteristic of development are:

How have they been identified?

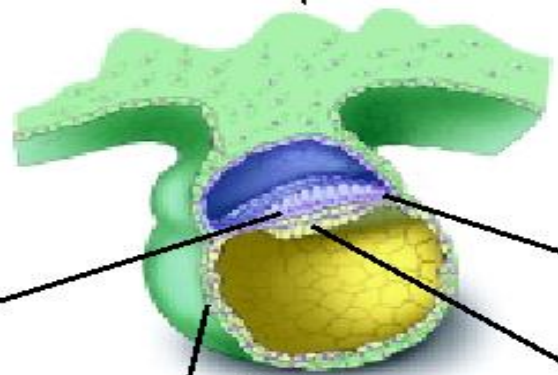




Zygote



Blastocyst



Gastrula

Ectoderm (external layer)

Mesoderm (middle layer)

Endoderm (internal layer)

Germ cells



Skin cells of epidermis



Neuron of brain



Pigment cell



Cardiac muscle



Skeletal muscle cells



Tubule cell of the kidney



Red blood cells



Smooth muscle (in gut)



Pancreatic cell



Thyroid cell



Lung cell (alveolar cell)

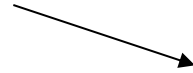


Sperm



Egg

Gastrulation paves the way for inductive interactions, which are essential for neurulation and organogenesis.



organs

Neurulation : neural tube: CNS

Neural crest- migrates away forming different cell types

Epidermis covering neural tube

Riassumendo, i processi principali
sono

- Fertilizzazione
- Cleavage
- Gastrulation
- Organogenesi
- Istogenesi

How is it controlled?

“Coordinating the activities and locations of the cells is a monumental task of logistics. Each cell has its own location and particular role to play in the body. Without coordination, chaos would result. Production of embryonic form and structure (morphogenesis) depends upon the concerted activities of many cells. Cells must often move relatively large distances within the embryo, and once they have arrived at their final destinations, they must establish stable multicellular structures with specific morphologies and functions. These activities require that cells have the ability to control their shape and to interact effectively with their environment. An understanding of how individual cells acquire their location, form and function during development is also a monumental task. Cell biology has provided the tools to study cellular behavior during development, and developmental biologists have seized upon the opportunities that these technologies provide for understanding how development proceeds- but the mechanisms still remain obscure.”

To summarise, we know what but not how, or why. For regenerative medicine it is the missing key.

I vincoli nella morfogenesi

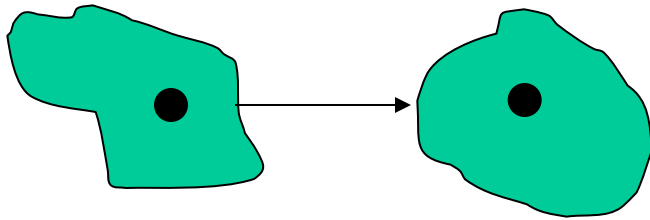
- Partecipano da 10 a 1000 cellule
- Le dimensioni sono meno di qualche mm
- I tempi sono del ordine di diverse ore o giorni (tempi di diffusione, movimento e differenziazione cellulare)
- L'energia disponibile è ?

I meccanismi di controllo

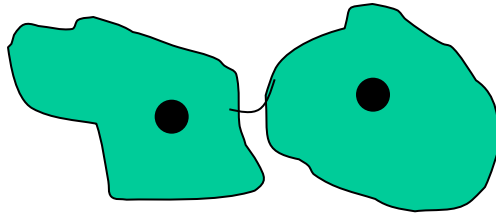
- Adesione differenziale
- Informazione posizionale
- Campi embrionici
- Campi morfogenetici
- Induzione

Control

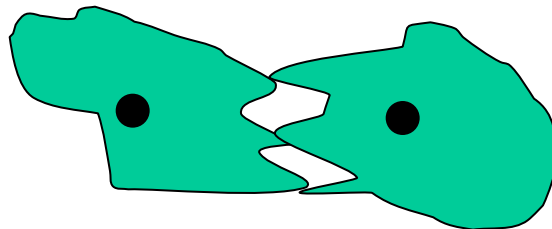
Induction: reorganisation of cells through interaction with other neighbouring cells



Diffusion of soluble agents

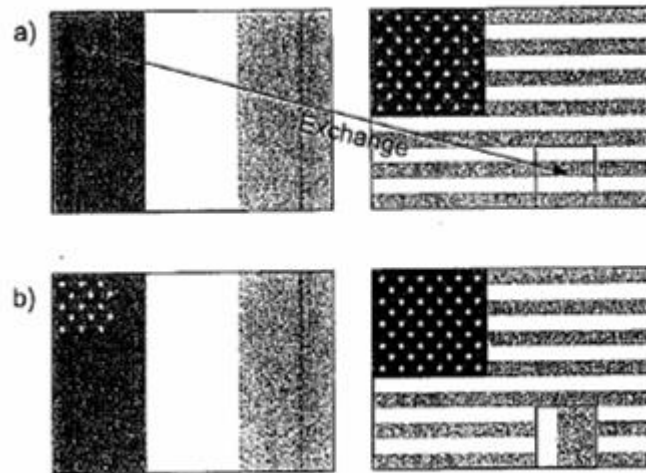


Contact through ECM



Contact through membrane receptors

Control : positional information



Questo tipo di esperimento fa vedere che l'informazione è contenuto nelle cellule ma viene anche da cellule intorno.
Es. Si trapianta la zona embrionale della coscia del drosophila sulla zona terminale dell'ala. Cosa forma il trapianto?

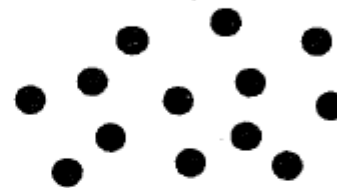
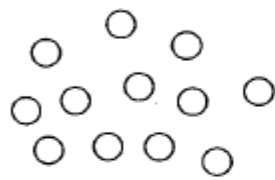
Embryonic
epidermal
tissue



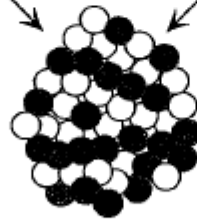
Embryonic
neural
plate



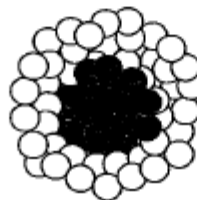
Dissociation



Reaggregation

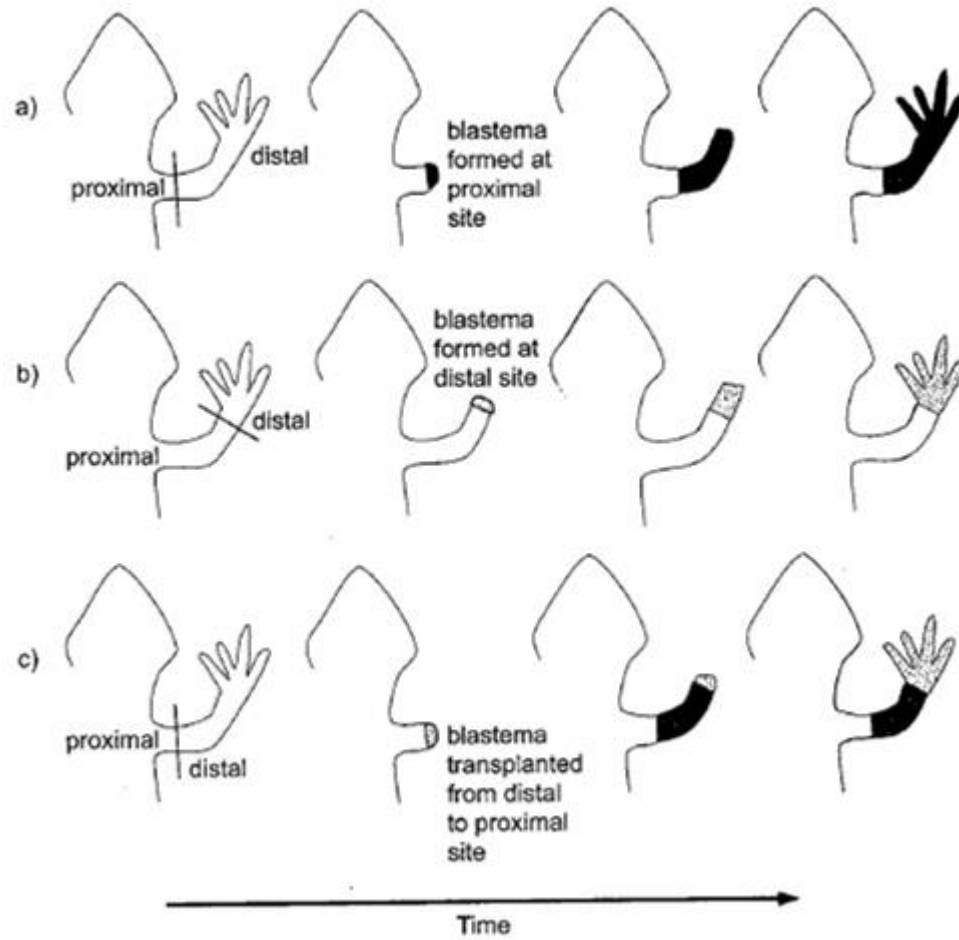


Rearrangement



Adesione differenziale

reaggregation in
vivo and
recreation of
primitive
structures
(Holtfreter)



Informazione posizionale

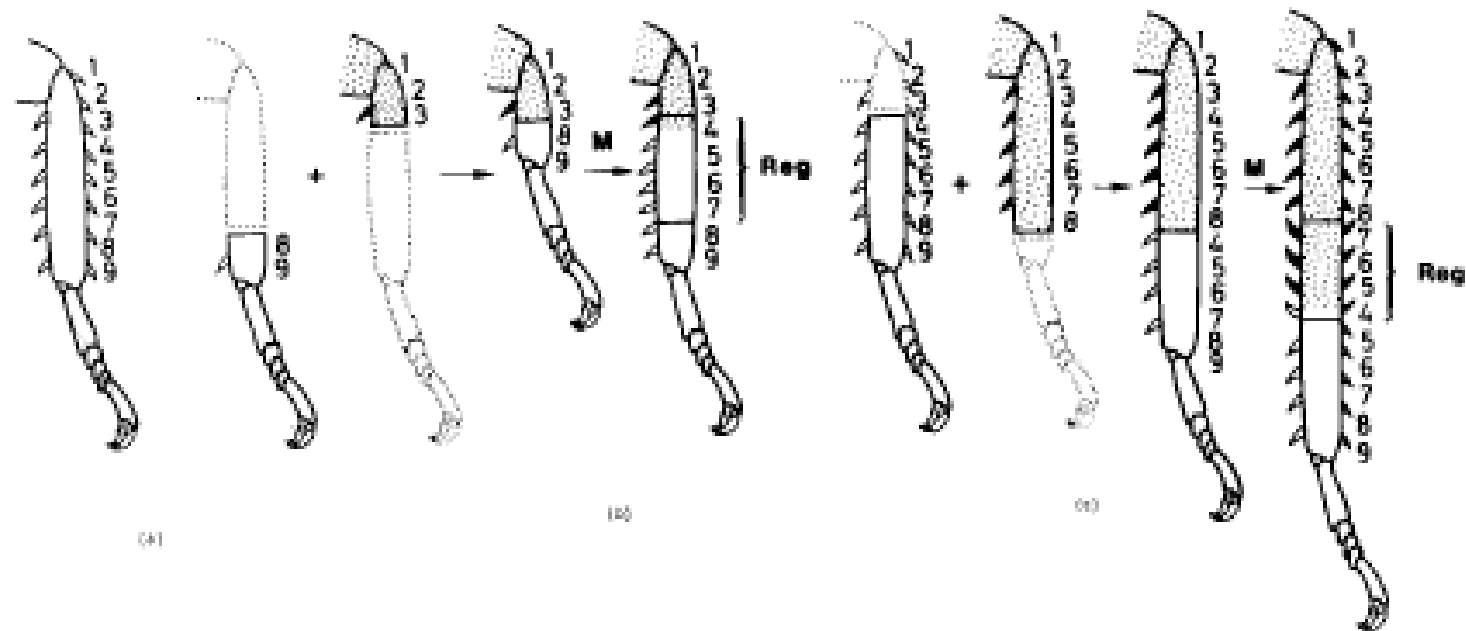
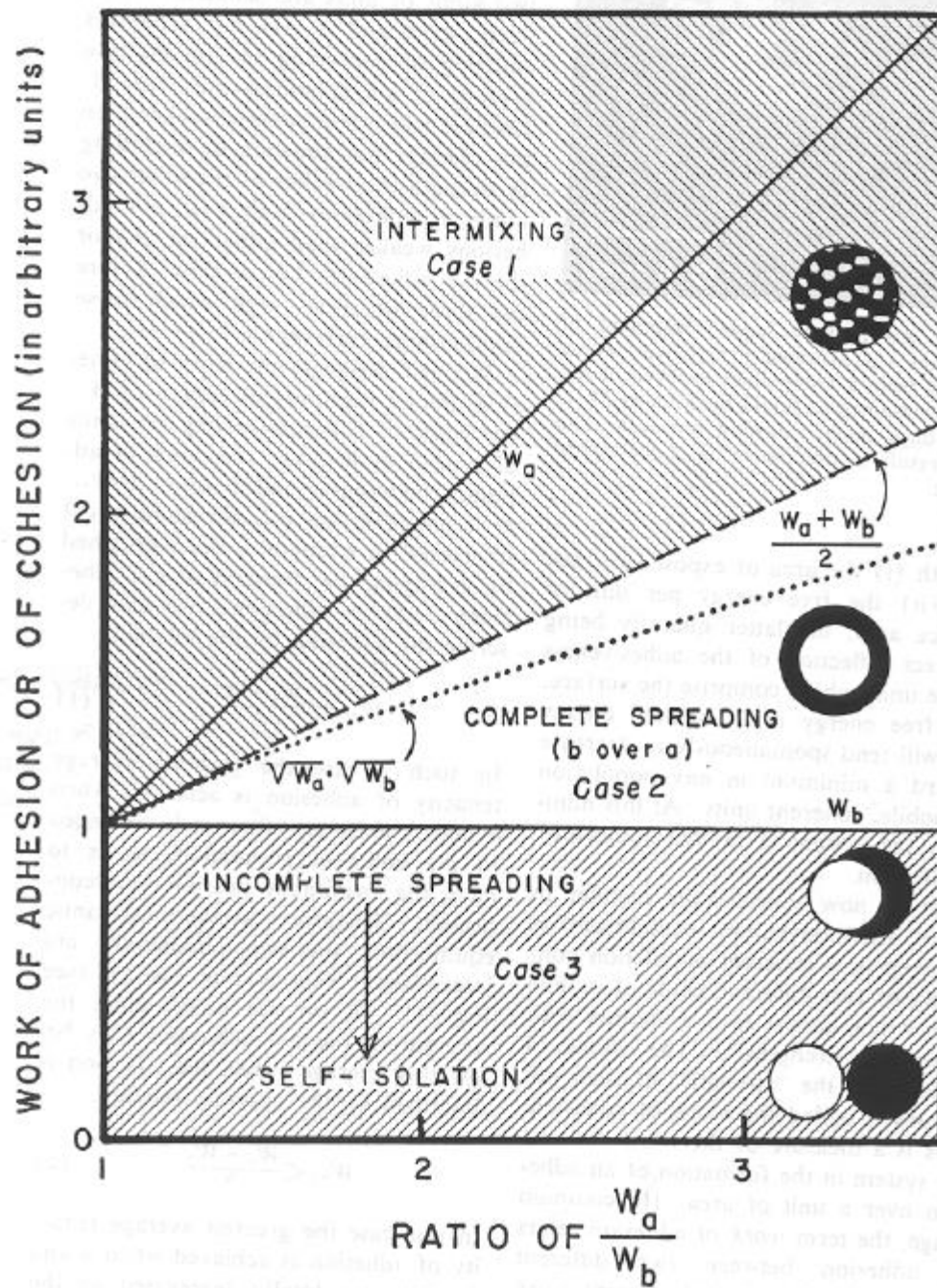
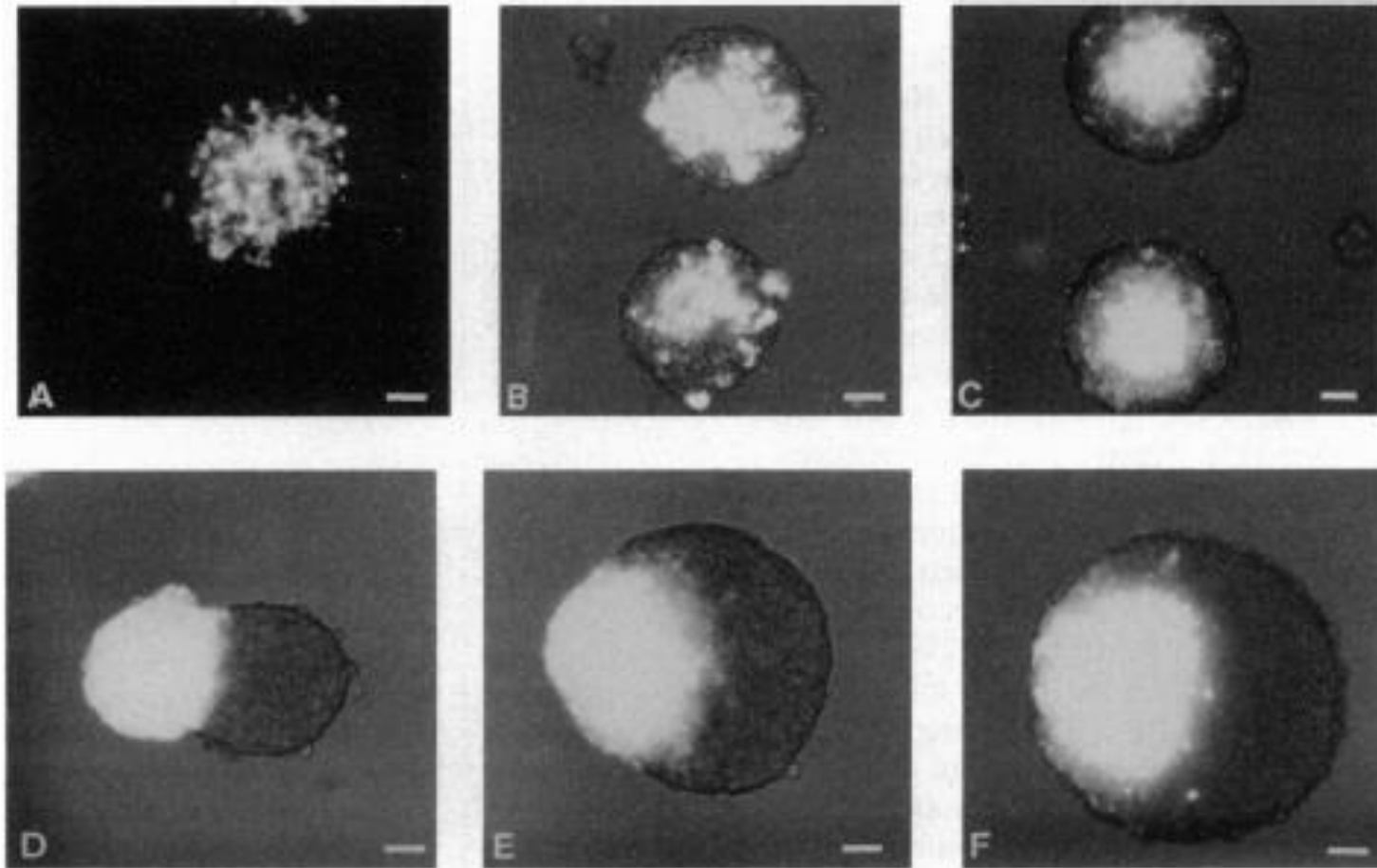


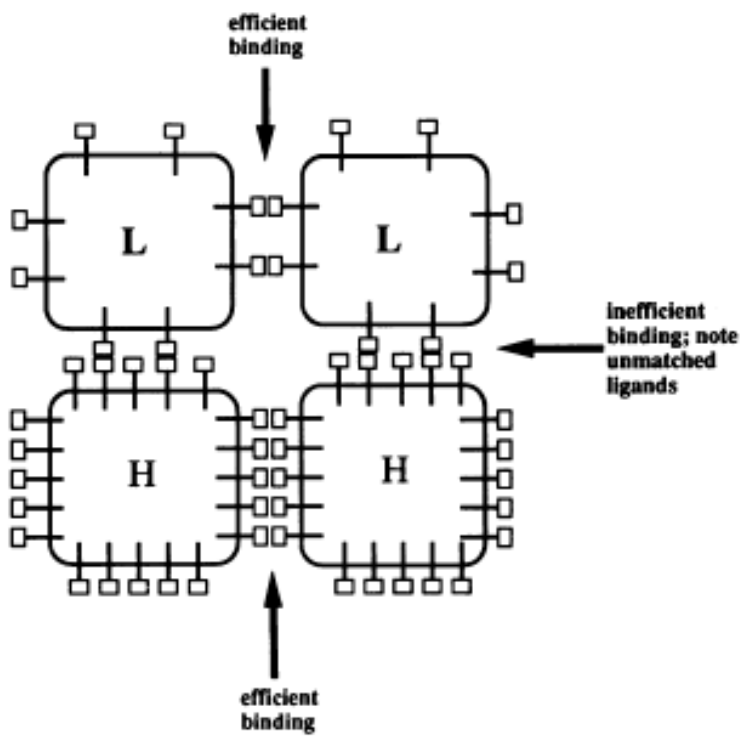
Figure 13.1: Intercalary regeneration in the proximo-distal dimension of cockroach legs (Bohn, 1970a,b, 1971; French, 1976a) (a) The levels of the tibia are denoted (arbitrarily) with 1,2...9. (b) The confrontation of a proximal 123- and a distal 89-piece leads, after one or two molds (M) to the regeneration of the missing elements. By using different species or mutants (stipled, clear) it has been shown that most of the regenerate is derived from the distal elements, indicating a distal to proximal respecification. (c) Surplus structures become duplicated. The regenerate is again derived mostly from those cells at the mismatching junction which carry the distalmost determination. The spines of the regenerate have a reversed orientation, indicating that the sequence of elements determines the polarity of the individual cells and not other way round. These experiments suggest a direct control of neighborhoods and argue against a long ranging positional information.

Steinberg (1963) proposed that cell sorting and movement was simply due to differences in adhesion and cohesion between units. He demonstrated this using thermodynamics.





2 cells with different levels of cadherin expression (1:20 expression ratio) . Aggregation and sorting in 4 days.



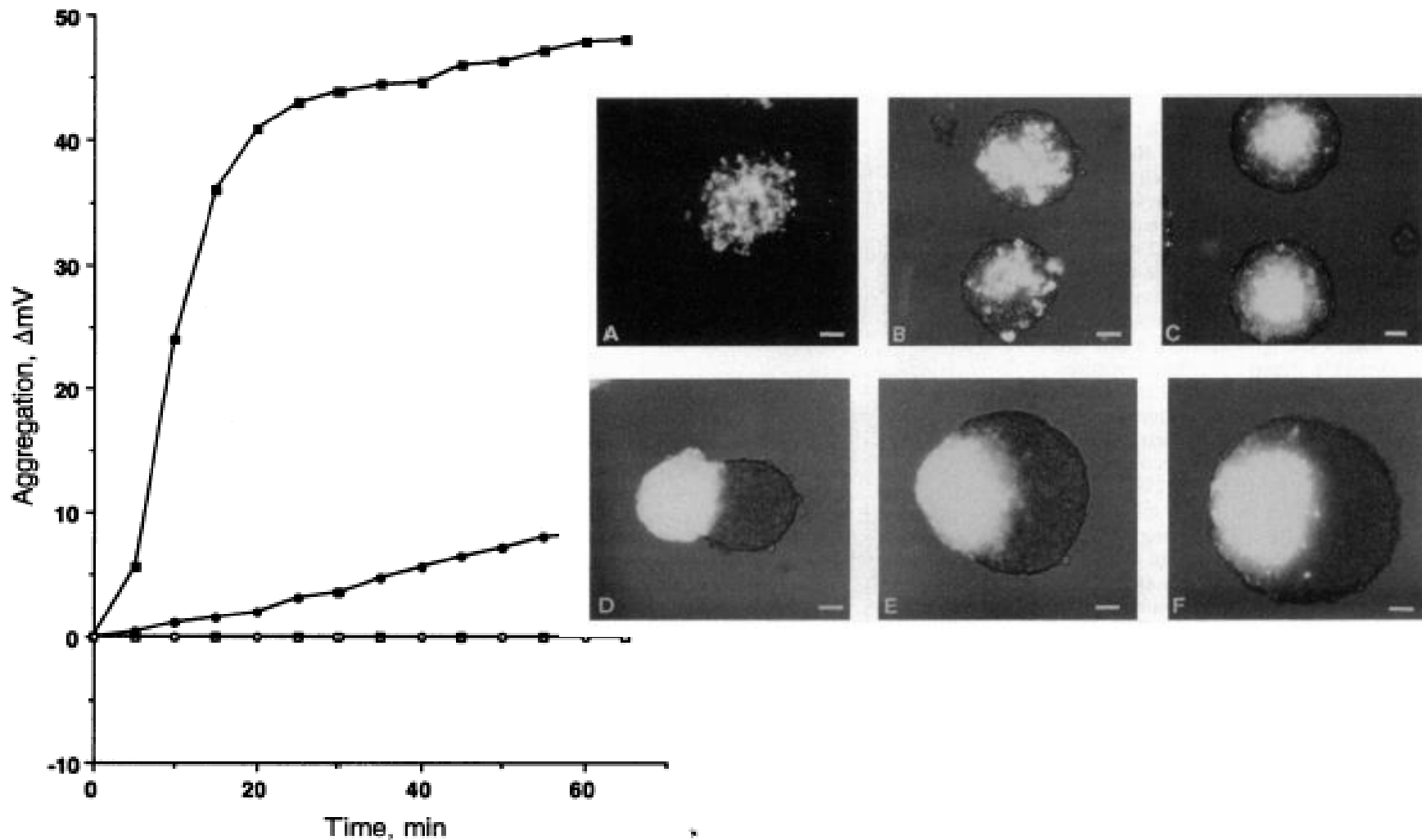
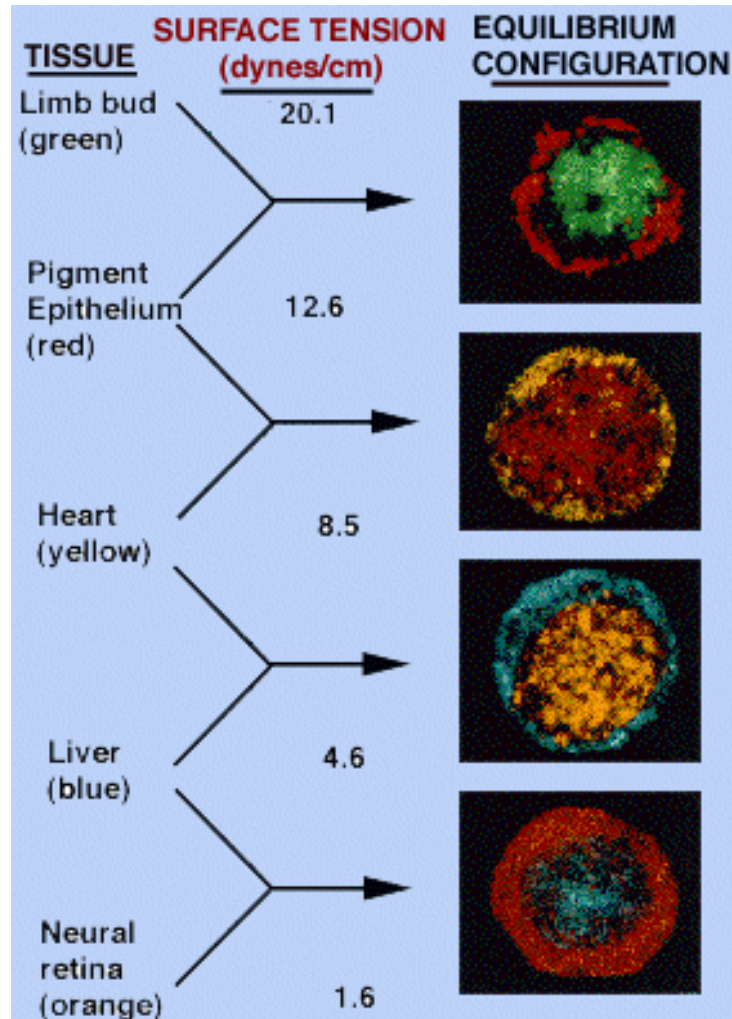


FIG. 1. Cell aggregation (expressed as ΔmV reading of the aggregometer). ■, PL β 2 cells + Ca²⁺; □, PL β 2 cells in low Ca²⁺; ●, PLs5 cells + Ca²⁺; and ○, PLs5 cells in low Ca²⁺.

PLs5- esprimono poco P-cadherin, PL β 2 ne esprimono 20 volte piu. Spiegare le curve

Control: positional information through differences in cohesion and adhesion



Morfogeno: molecola capace di indurre il differenziamento

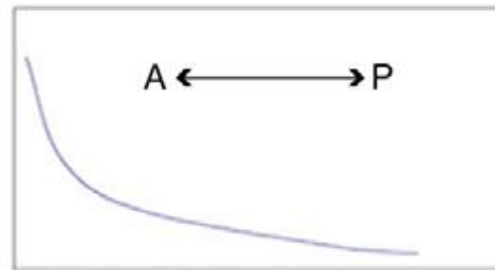
Morfogeni e Controllo

Il meccanismo della morfogenesi è diverso da quello dell'organizzazione iniziale dell'embrione.

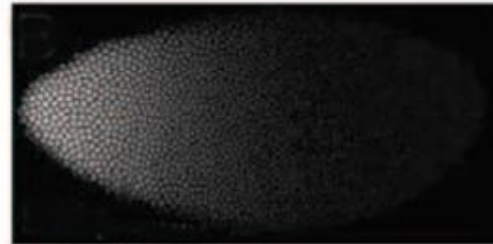
Formazione di pattern: più complesso rispetto al sorteggio basato sui CAM

- Si sa che la differenza tra una cellula e l'altra è determinata da **CAM, posizione e gradienti molecolari**.
- Le differenze si evidenziano molto presto (es nel embrione dovute a polarità), e poi grazie ai **gradienti morfogeni**. Un esempio classico nella biologia dello sviluppo è il **gradiente biocoide**

B Graded Bicoid and anteroposterior polarity



Bicoid distribution



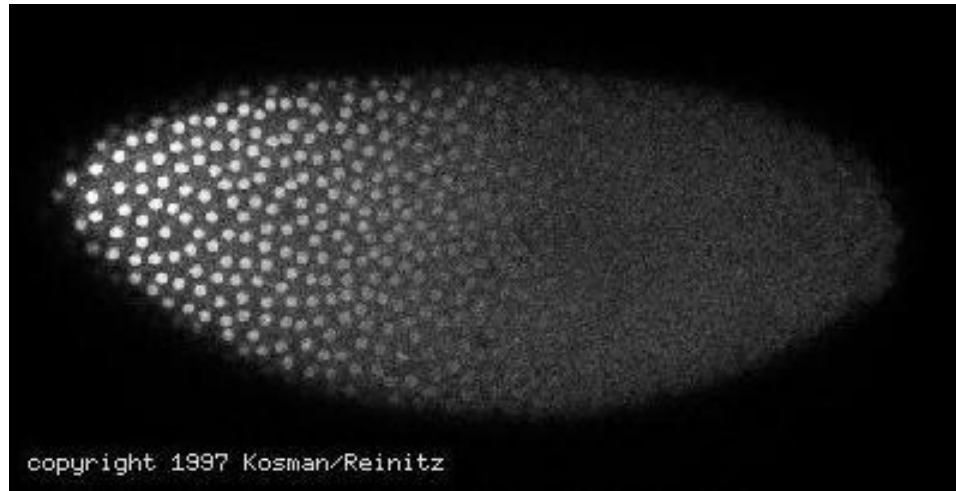
Bicoid protein



orthodenticle

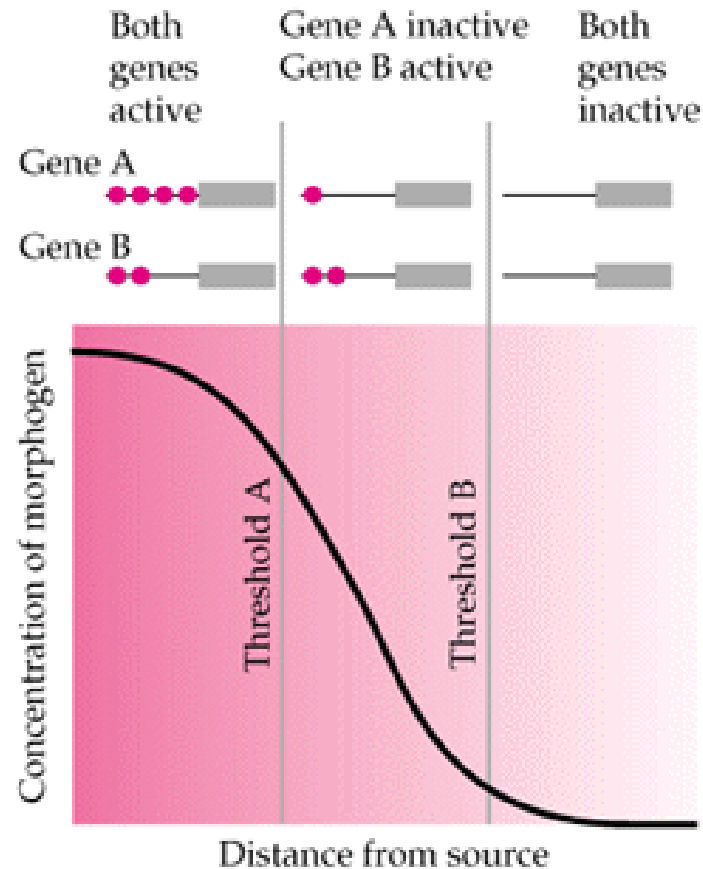


hunchback

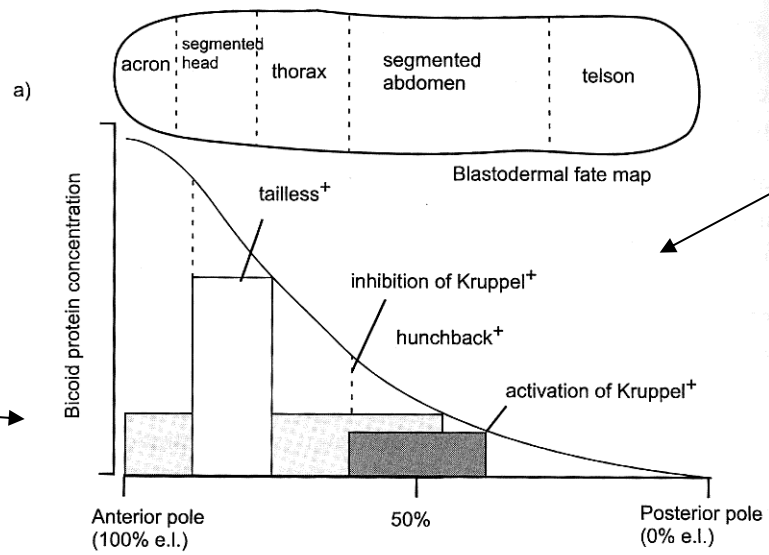


La proteina bicoide è un fattore di trascrizione → regola il livello di espressione di geni nell'embrione (drosophila) . mRNA bicoide viene prodotto dalla madre, tradotto e poi si diffonde nell'embrione dove regola diversi geni a seconda della sua concentrazione.

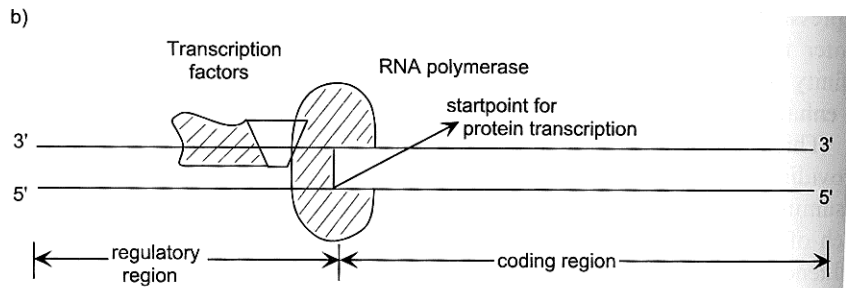
Transcription factor: protein which binds to DNA promoter regions and regulates the transcription of the gene. The affinity of the binding region determines the threshold concentration required for enhancing expression.



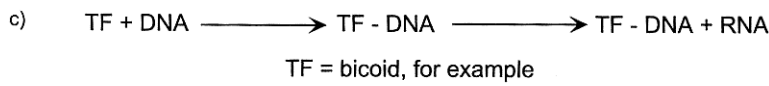
Expression level



Different genes



Tf binds to DNA and inhibits or facilitates transcription



These are its characteristics: k about $1e-4 \text{ s}^{-1}$

Diffusion constant $1e-7 \text{ cm}^2/\text{s}$

Size of embryo: about 1000 micron. Bicoid protein diffuses freely into embryo.

$$\frac{dC}{dt} = D \frac{d^2C}{dx^2} - kC$$

I vincoli

No di cellule: $20 < 1000$

Dimensione fisiche delle zone di riorganizzazione: 100 micron $< 1\text{mm}$

Tempo : ore, giorni

Densità cellulare nell'uomo: $1-3 \cdot 10^9$ cellule/ml. Calcolare il no totale di cellule in un uomo di 70 kg.

La subunità funzionale di un organo è di 100×100 micron (nefrone, capillare, unità epatocitaria, ghiandola). Calcolare il no di cellule in una subunità.

* 100 micron è importante per O_2

La formazione di pattern è stato dibattuto per più di 50 anni (Turing, 1952). Come fanno cellule vicine a sapere che devono essere diverse (es. i capelli)? La mano si forma così perché le cellule al confine diventano epiteliali.

Segnali

Morphogenesis :pattern, sorting

Cell-cell signalling

Cell-ECM signalling

{ Chemotaxis, hapotaxis, galvanotaxis
Contact guidance e inibizione del contatto }

Migrazione

Cell surface receptors

Recettore	Ligando	R_T (numero/cellula)	k_f ($nM^{-1} min^{-1}$)	k_r (min^{-1})	K_D (nM)
Trasferrina	Trasferrina (trasportatore ferro negli epatociti)	50000	0.003	0.1	33
EGF	EGF (fattore di crescita epidermale)	25000	0.18	0.12	0.67
Fibronectina (integrina)	Fibronectina	50000	0.0007	0.6	860
Insulina	Insulina	10000	0.0096	0.2	21
TNF	TNF (citochina)	6600	0.93	0.14	0.15
Interleuchina 2	Interleuchina 2 (citochina)	200	1.89	0.014	0.0074

CAM :Cell Adhesion molecule, classified as CSR : cell surface receptors. Common names VCAM, PECAM.

Cells can adhere to each other

Or to the ECM

CAMs are responsible for structural integrity of adherent cells

There are 3 types of junctions between cells and cells or cells and ECM

Tight junctions- especially in epithelial cells, they prevent diffusion of molecules

Communicating junctions – gap junctions, they regulate transport. For example in the liver and kidney

Anchoring junctions- they provide mechanical links- through integrins and cadherins



Linked to the cytoplasm
through cytoskeleton

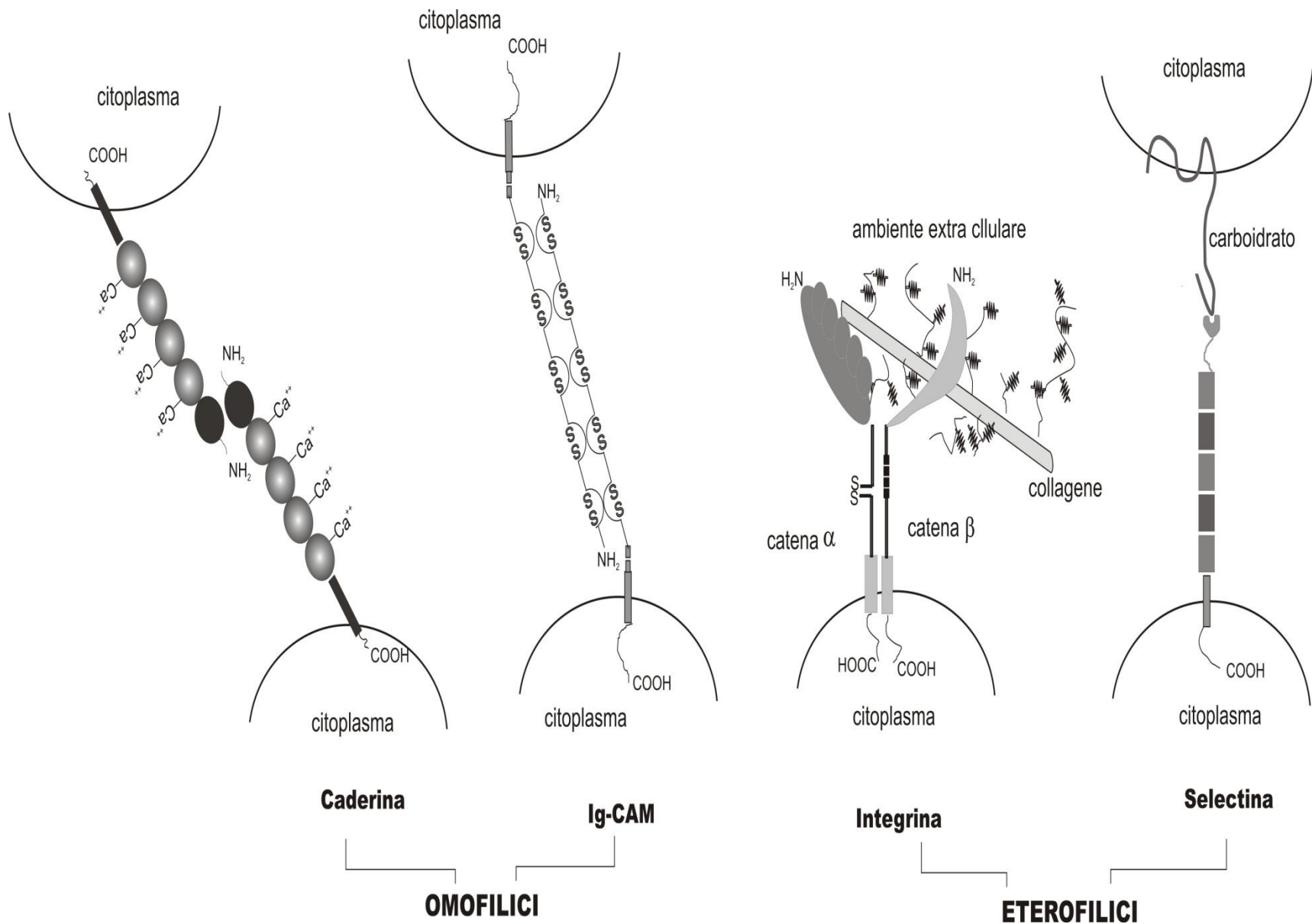
~~Three types of anchoring junctions:~~

- ~~•adherens -actina~~
- ~~•Desmosomes-filamenti intermedi~~
- ~~•Hemidesmosome- solo ECM fuori e
filamenti intermedi dentro~~

CAMs

Il meccanismo di riconoscimento attraverso i CAM è uno dei principali modi in cui la cellula interagisce con suo ambiente.

CAM	Caratteristiche
Integrine	-legano ai ligandi adesivi della matrice extra cellulare, sono detti legami eterofilici
Caderine	- legano a cellule vicine, generalmente omotipici (caderina-caderina) e sono calcio dipendenti. Le caderine sono fondamentali per la morfogenesi.
Ig CAM	- legano a altre cellule, generalmente formando legami omotipici, sono meno forti di legami caderine-caderine e sono le uniche CAM che non dipendono dalla presenza di calcio.
Selectine	- legano a mucine (la parte glicosata delle proteine), quindi formano legami eterofilici.



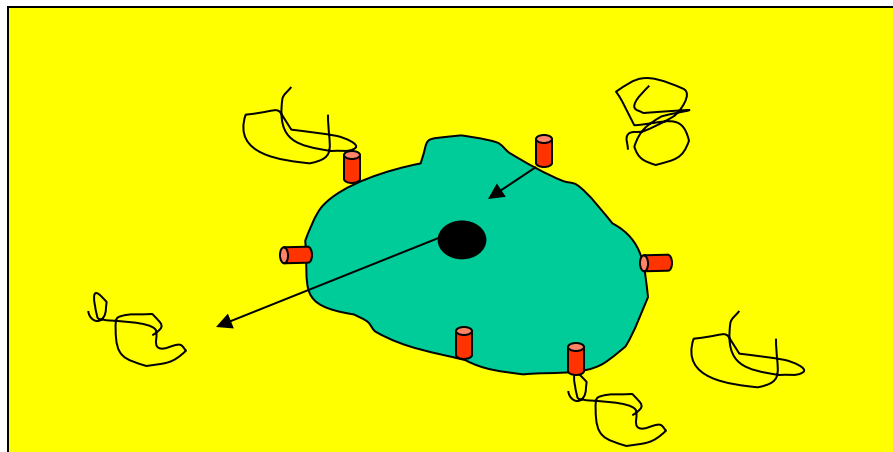
Ripassare ECM

- Le molecole dell'ECM: GAG, HA, elastina, collagene, fibronettina, laminina ecc. Calcio, sodio, acqua, fattori di crescita ecc.
- Le macromolecole hanno elevato peso molecolare e diffondono poco, si possono considerare “fisse”. La classe più importante di CSR (o CAM) per la ECM sono le INTEGRINE.

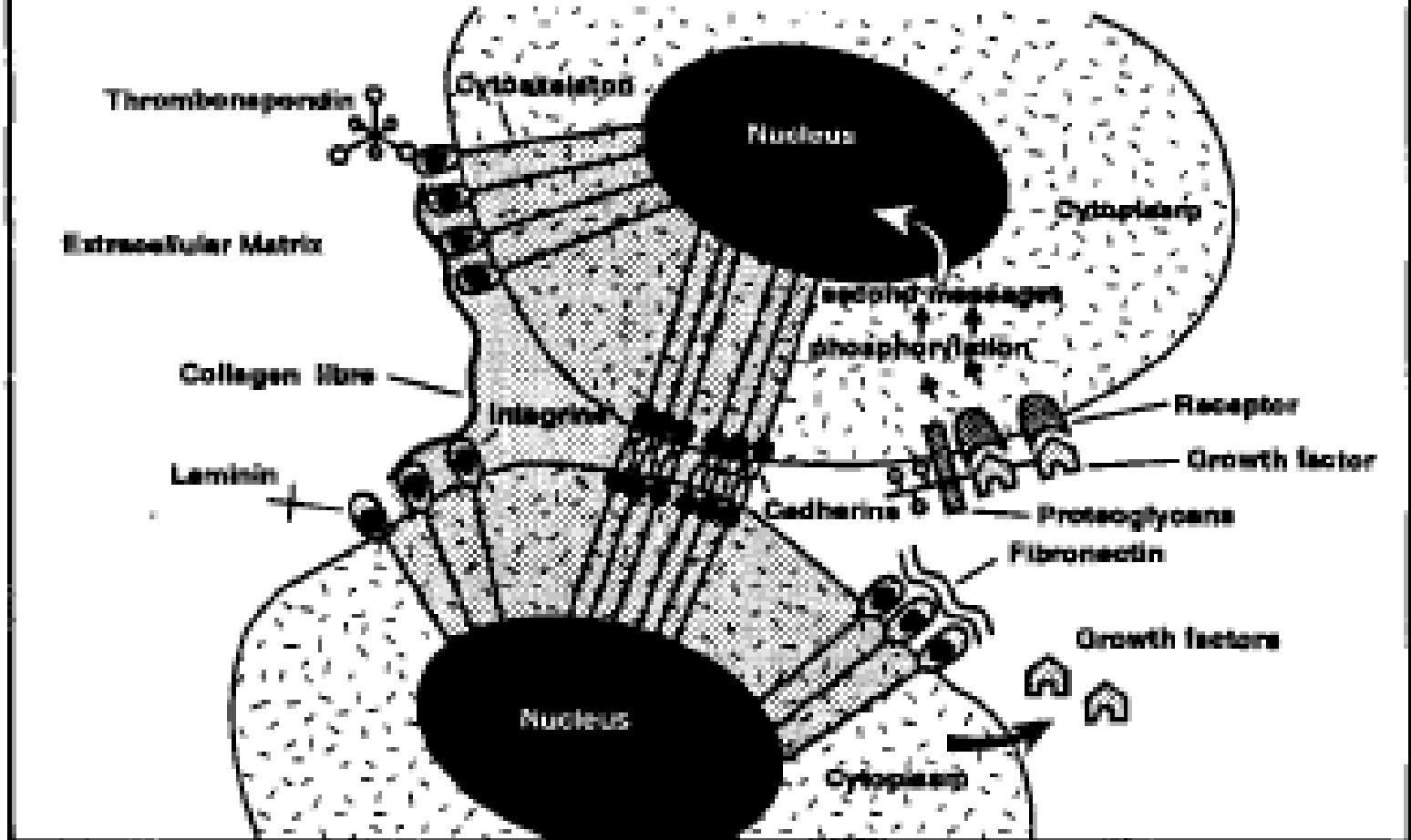
Le integrine

L'importanza dell'interazione tra cellule e la ECM. Livello macromolecolare. L' ECM non è solo una struttura di supporto ma gioca un ruolo attivo e importante in tante funzioni cellulari. Migrazione, proliferazione, differenziazione, apoptosis. Inoltre modula l'espressione delle citochine e i fattori di crescita e attiva la trasduzione e segnalazione intracellulare. Il rapporto cellule ECM funziona per reciprocità dinamica. La ECM è l'ambiente che regola la dinamica dell'espressione genetica e differenziazione.

Le molecole del ECM interagiscono con i recettori (CSR-cell surface receptors, in particolare i CAM) che trasmettono segnali attraverso la membrana a molecole dentro i citoplasma. Questi segnali iniziano una cascata di eventi attraverso il CSK al nucleo (cytoskeleton) che risultano nell'espressione di geni. Questi vanno trascritti in proteine che hanno un effetto sull' ECM.



The Extracellular Matrix In Cellular Interactions



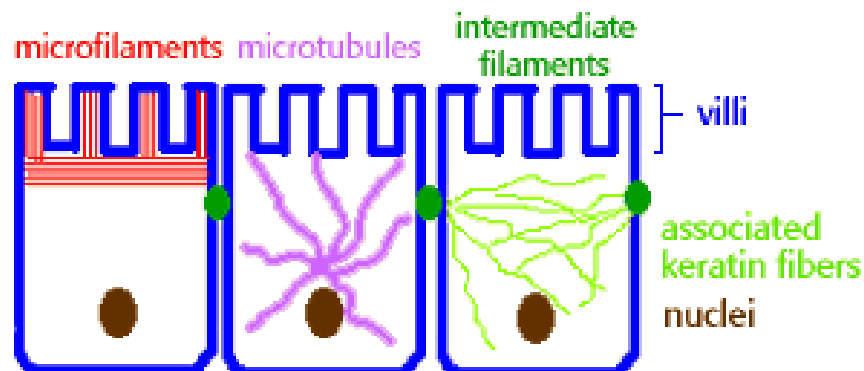
The cytoskeleton: microfilaments, intermediate filaments and filaments

Micro filaments: Actin – contractile 3-6 nm

Intermediate filaments (fibrous proteins eg desmin, vimentin)-
10 nm. - tensile, rope like structures, much longer than actin.
Form the structural framework in the cell.

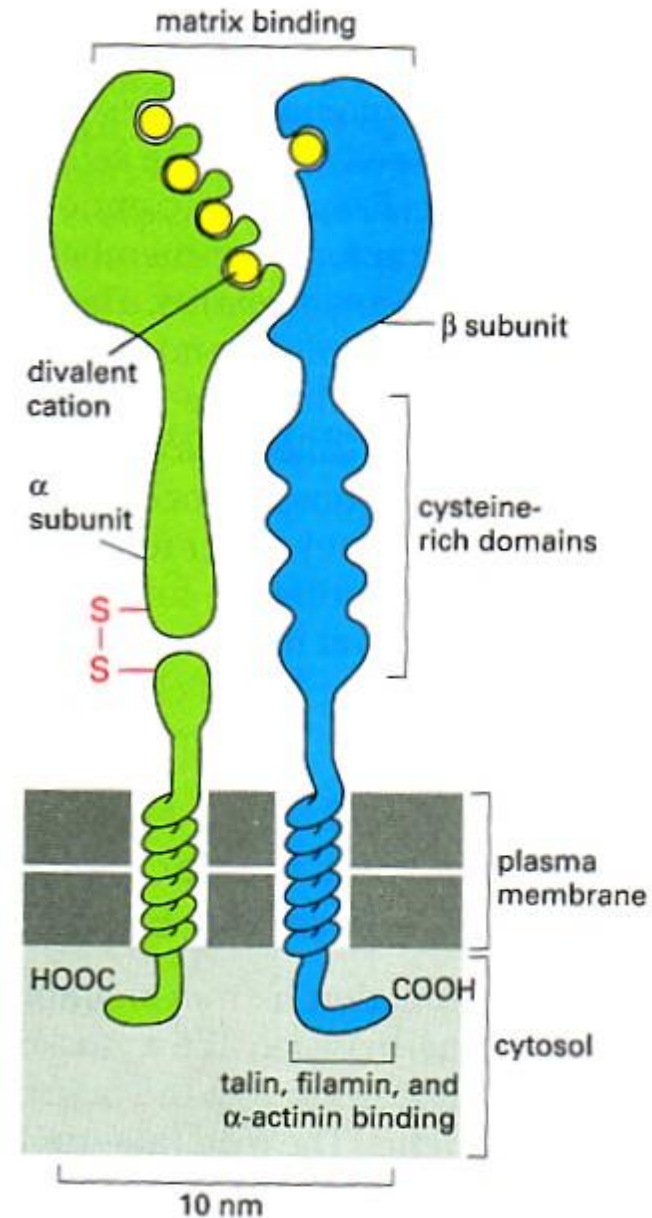
Filaments: microtubules 25 nm. Cell shape and
motility. Tracks for vesicle movement

Cytoskeletal components of intestinal epithelial cells



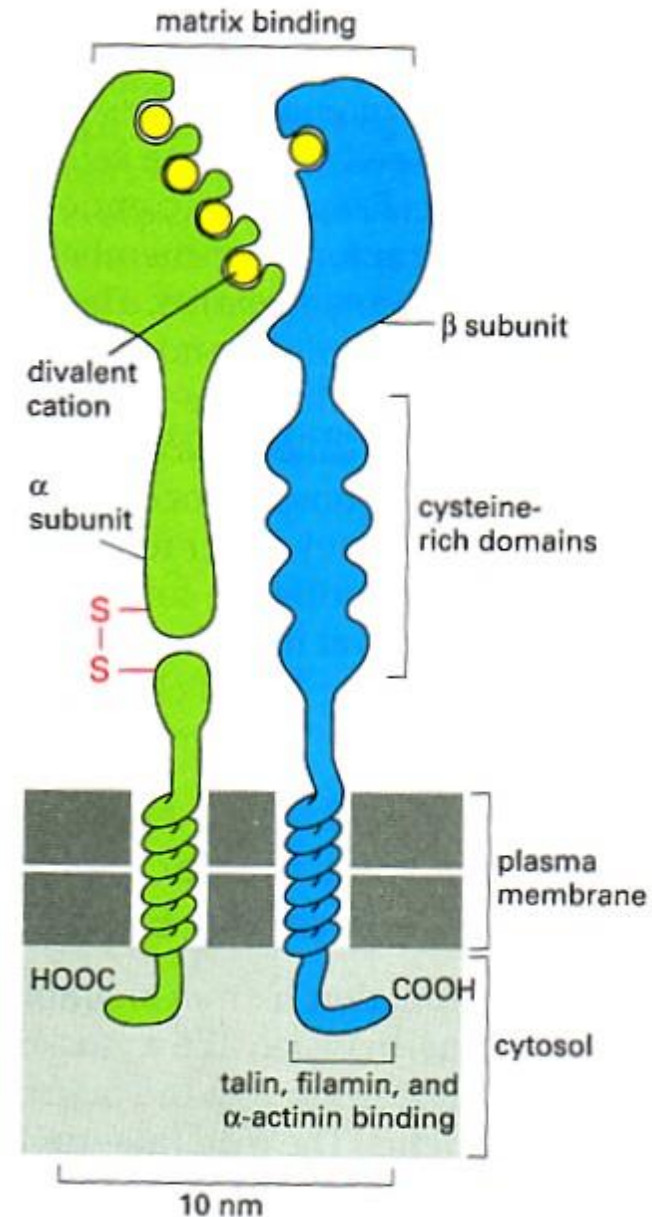
Le integrine

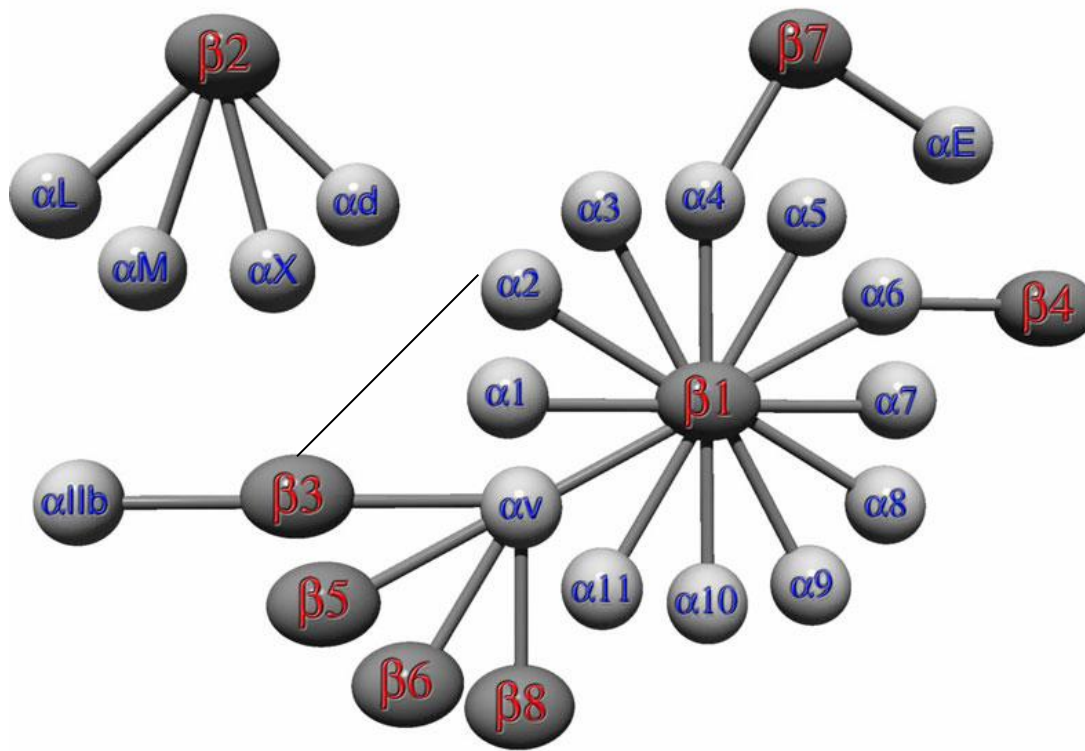
Sono delle proteine recettori che stanno sulla membrana cellulare, e modulano le interazioni tra cellula e la MEC. Tra queste interazioni, differenziazione, apoptosi, adesione, guarigione (“wound healing”). Insieme con le caderine, formano la famiglia di proteine recettori che sono coinvolte nelle interazioni cell-cell e cell-ECM.



Sono proteine transmembrane con 2 subunita glicoproteiche , alpha e beta non legate cov. tra di loro. Si dice proteine eterodimeriche in cui le varie α e β sono omologhe fino al 40% . Per ora sono state identificate 9 subunita α e circa 16 β , e 24 integrine. Di queste 8 riconoscono Fn e 5 laminina. La catena α è piu specifico nel riconoscimento.

Che differenza c'è tra la struttura delle integrine e quella dei anticorpi?





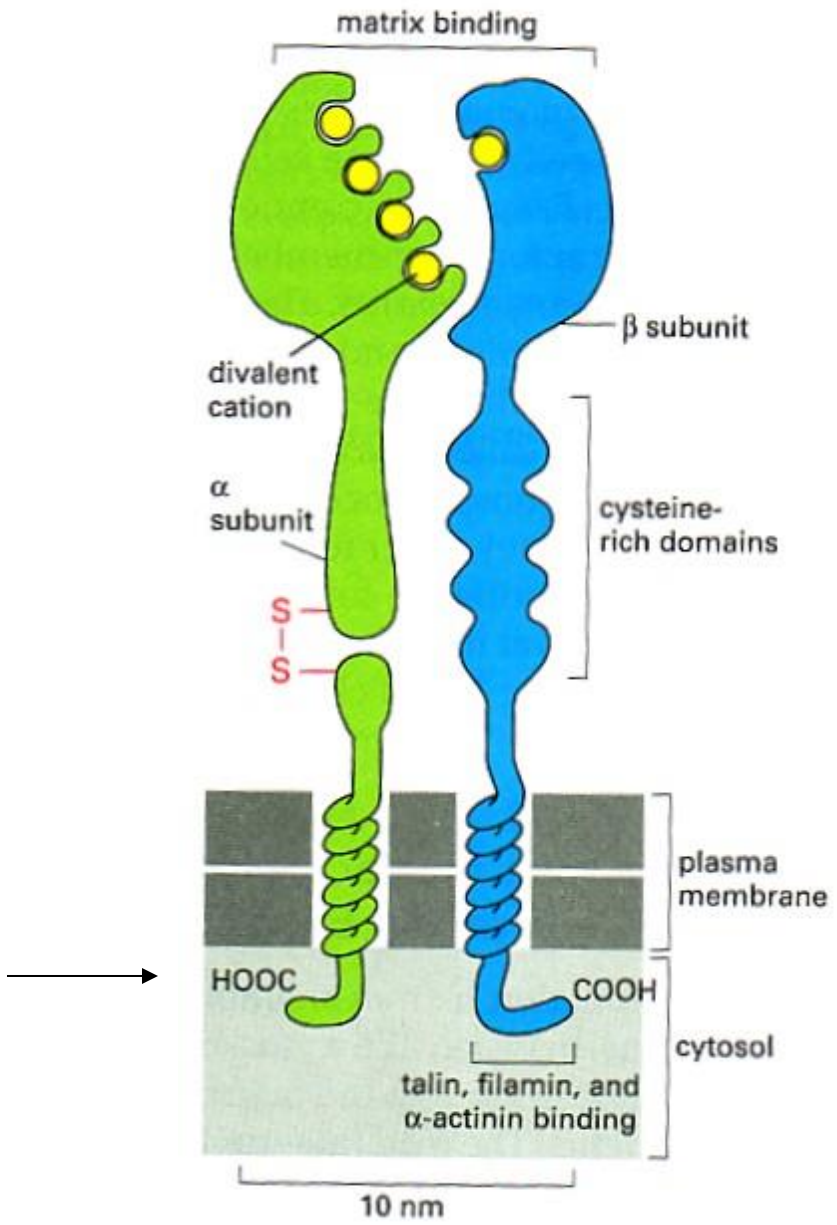
integrins.hypemart.net

INTEGRIN	LIGAND*	DISTRIBUTION
$\alpha_5\beta_1$	fibronectin	ubiquitous
$\alpha_6\beta_1$	laminin	ubiquitous
$\alpha_7\beta_1$	laminin	muscle
$\alpha_L\beta_2$ (LFA-1, see p. 1411)	Ig superfamily counterreceptors	white blood cells
$\alpha_2\beta_3$	fibrinogen	platelets
$\alpha_6\beta_4$	laminin	epithelial hemidesmosomes

*Not all ligands are listed.

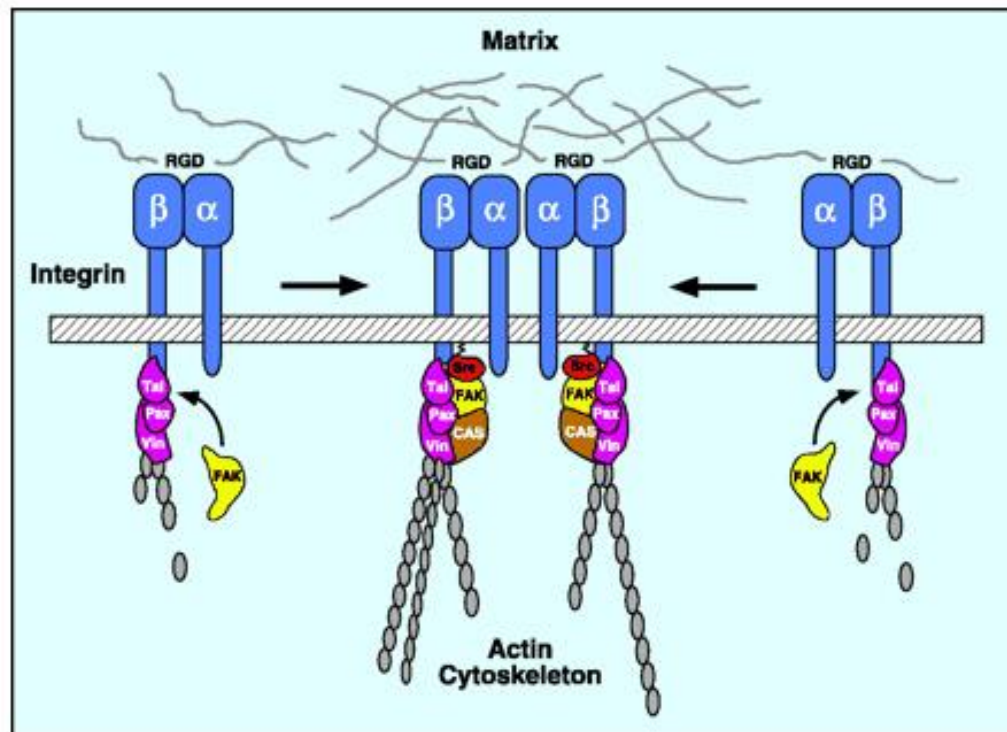
Integrin binding is calcium dependent. ECM proteins have specific amino acid sequences which bind to integrins. The most well known sequence is the RGD tripeptide (arginine, glycine, aspartic acid). Found in fibronectin, collagen, laminin. The alpha subunit is mainly responsible for recognition.

50 AA residues



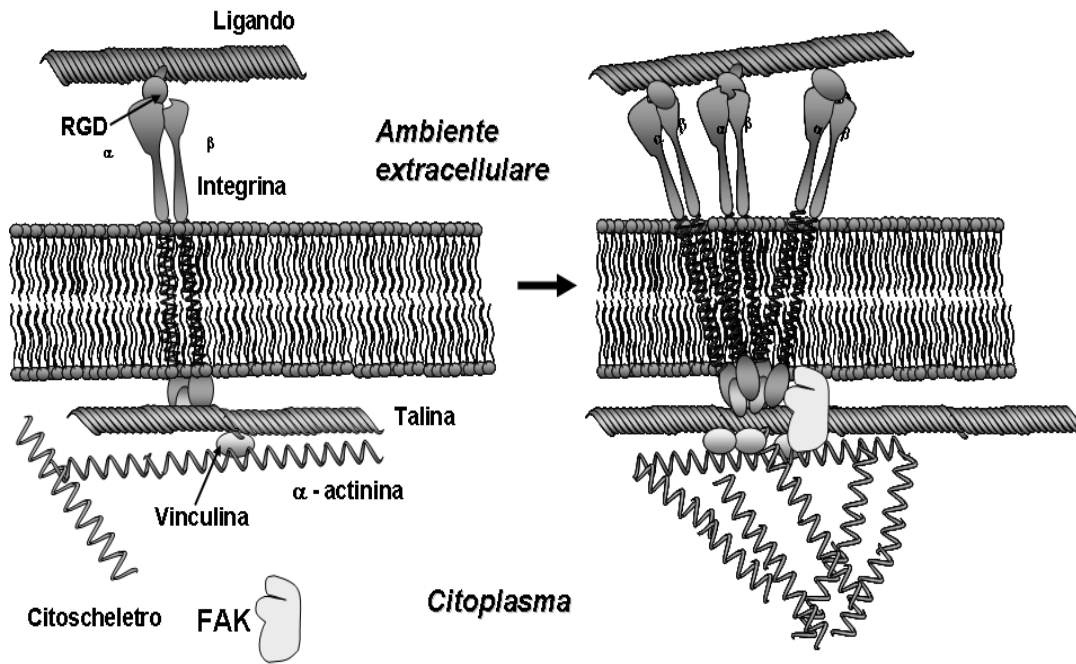
- Gran parte dell'integrina sta fuori nello spazio extra cellulare.
- La parte extra c. del dominio α ha 4 siti per legare a ioni $++$ e sono coinvolti nel legame calmodulina che è sempre presente nelle interazioni.
- Il legame con la ECM induce dei segnali intra cellulari. La parte interna interagisce con il CSK. *In generale, segnale dal ECM attraverso le integrine vengono trasdotte via il CSK e induce cambiamenti di forma che portano a movimento, proliferazione, differenziazione ecc.*
- Alcuni recettori sono specifici altri riconoscono più epitopi
- Possono anche diversificarsi (plasticità e ridondanza)
- Affinità 10^6 - 10^9 litri/mole. Da confrontare con l'affinità anticorpo-antigene.
- Sono presenti in concentrazioni da 10 o più di 1000 per cellula. La loro azione dipende dalla concentrazione locale di ligandi, e possono solo agire quando presente in densità locali grandi (zone di adesioni focali o emidesmosomi). Quando sono diffusi in maniera omogenea sulla CM, non c'è adesione. Dopo alcuni stimoli, si raggruppano in contatti focali, e la somma delle loro affinità per unità di area aumenta. Le integrine possono spostarsi per espolarare l'ambiente. Se l'affinità fosse alta, non sarebbe facile interrompere il legame e non ci sarebbe motilità cellulare.
- Multiple weak adhesions-----few strong adhesions [440 nm e 160 nm]

- Le I si raggruppano e inizia una cascata di segnali
- Focal adhesion kinase (FAK)*, un enzima tyrosina kinase è coinvolta
- FAK arriva agli contatti focali e viene fosforilato, iniziando una cascata di reazioni (quasi sempre di fosforilazione) che finiscono in una concentrazione di proteine nella zona focale.
- Il segnale viene trasmesso all'interno della cellula attivando l'organizzazione dello citoscheletro



What is protein phosphorylation?

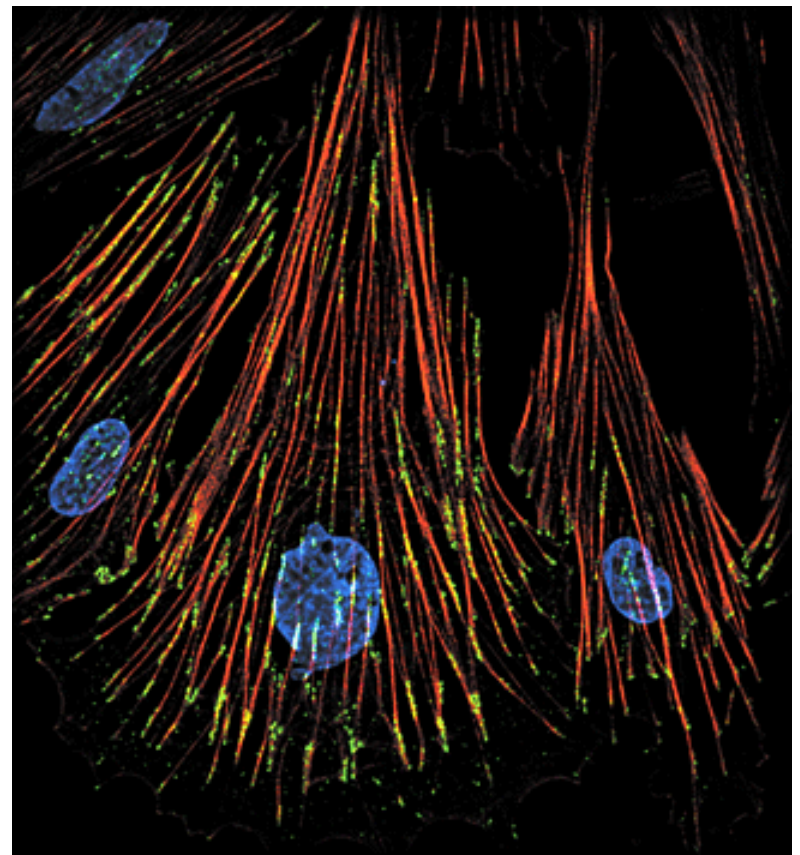
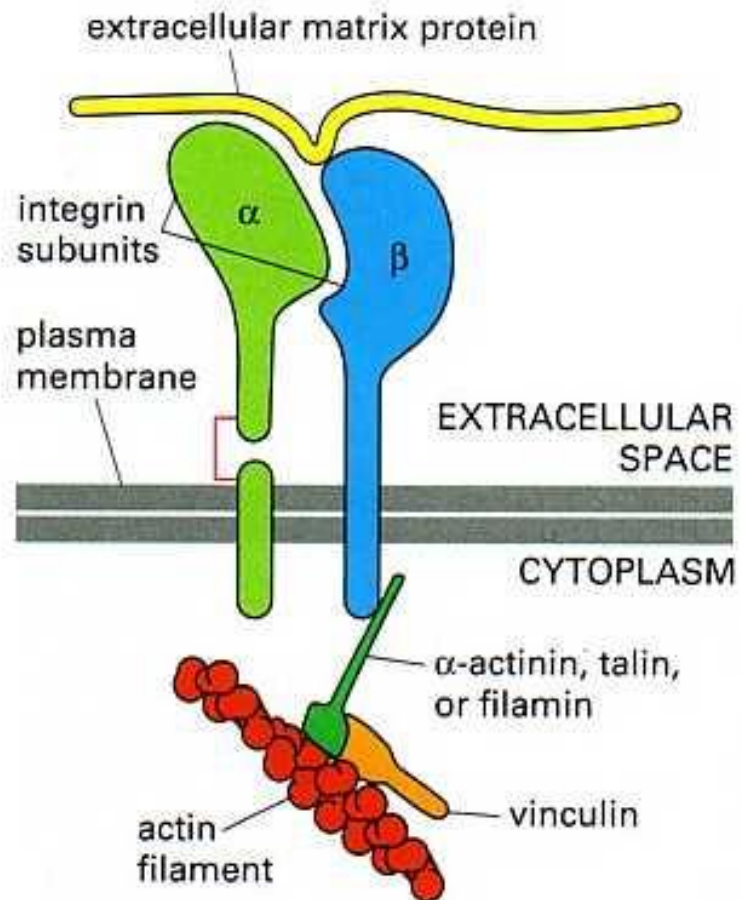
- Addition of a PO_4^{---} group to a protein. Makes the protein hydrophilic and polar, changes conformation. Thus activates other proteins (enzymes)
- Phosphorylation forms the basis of many enzymatic biochemical reactions.
- AA which phosphorylate are serine, threonine, tyrosine
- Protein kinases and phosphatases add PO_4 , phosphatases dephosphorylate
- It is a bit different to oxidative phosphorylation, why?



Quando l'ambiente extra cellulare è ricco di ligandi adesivi, le integrine migrano verso un punto comune della membrana per formare contatti focali. La zona citoplasmica delle integrine è associata con alcune protine (talina, vinculina e α -actinina) e nelle zone focali si forma un complesso proteico grazie all'attività dell'enzima FAK (focal adhesion kinase). Questo complesso proteico (FAC focal adhesion complex) è capace di attivare una cascata di segnali che inizia con la fosforilazione della FAK e con il conseguente accoppiamento di quest'ultimi con i microfilamenti del citoscheletro. Grazie a queste interazioni, il citoscheletro viene riorganizzato, riorientato e contratto; formando così le cosiddette fibre di stress-cioè fibre di actina polimerizzate, e la cellula viene ancorata alla ECM. Un ancoraggio organizzato e meccanicamente consolidato si chiama adesione focale.

Il processo di adesione

1. L'integrina lega al RGD (pochi secondi)
2. La prima proteina (già presente) è talina, quasi sempre associata a vinculina. Talina ha siti per legarsi a integrine, actina e vinculina. Questa è la prima proteina che cambia conformazione
3. La proteina alfa actinina lega fibrille di actina ai CAM. Questa proteina reticola le fibrille di actina che polimerizzandosi diventano filamenti contrattili, formando le microfibrille. Altre proteine importanti sono la filamina e la paxillina
4. In presenza di più integrine arriva il FAK *Focal adhesion kinase*, un enzima tyrosina kinase, che legandosi al complesso proteico si fosforilizza (a un residuo tyrosina) e così diventa altamente reattivo iniziando la cascata di reazioni e la formazione di un complesso proteico sotto l'integrina.
5. Di seguito c'è una riorganizzazione del citoscheletro, e la cellula diventa rigida, contrattile. Di solito c'è anche l'espressione proteica. T= poche ore.
 6. Il segnale viene così trasmesso all'interno della cellula.

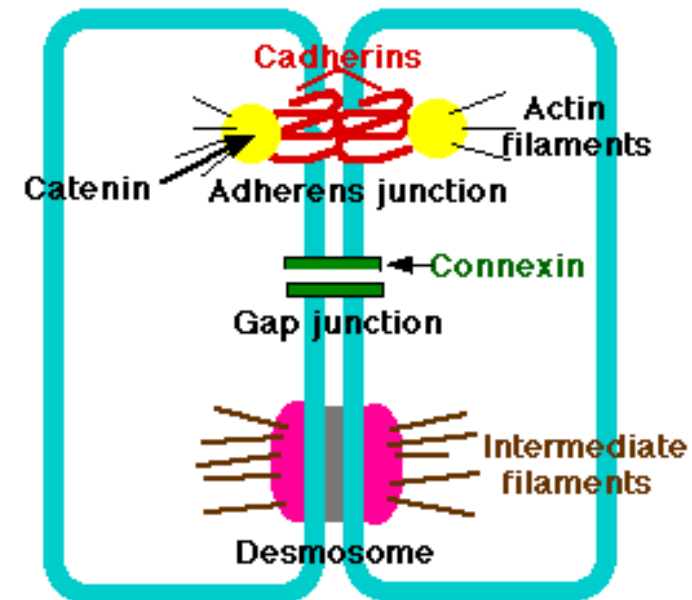


Le Caderine

Sono molecole presenti nei tessuti dei vertebrati e la loro azione dipende dalla presenza di calcio. Inizialmente sono state nominate in base al tessuto di appartenenza: caderina-E (epitelio), caderina-N (nervi) e caderina-P (placenta). Ogni tipo di cellula esprime un determinato set di caderine, che può cambiare se le funzioni della cellula cambiano. La porzione extracellulare è molto estesa e composta da cinque domini, di circa 100 amminoacidi ciascuno. Quattro di questi domini sono omologhi e contengono siti di legame per il calcio, ione indispensabile per la loro funzione. Solitamente le caderine sono impegnate in legami omofilici, di conseguenza, le caderine presenti sulla superficie di una cellula si legano alle caderine presenti sulle superfici cellulari adiacenti. Diverse malattie sono associate con la

disfunzione delle caderine.

adiacenti. La loro affinità è piuttosto bassa, e il principio di funzionamento è simile a quella delle integrine.



Le Ig-CAM

Questi recettori assomigliano agli anticorpi e sono importanti nella regolazione fine della coesione, soprattutto nell'embrione. (Ca⁺ independent)

Le Selectine

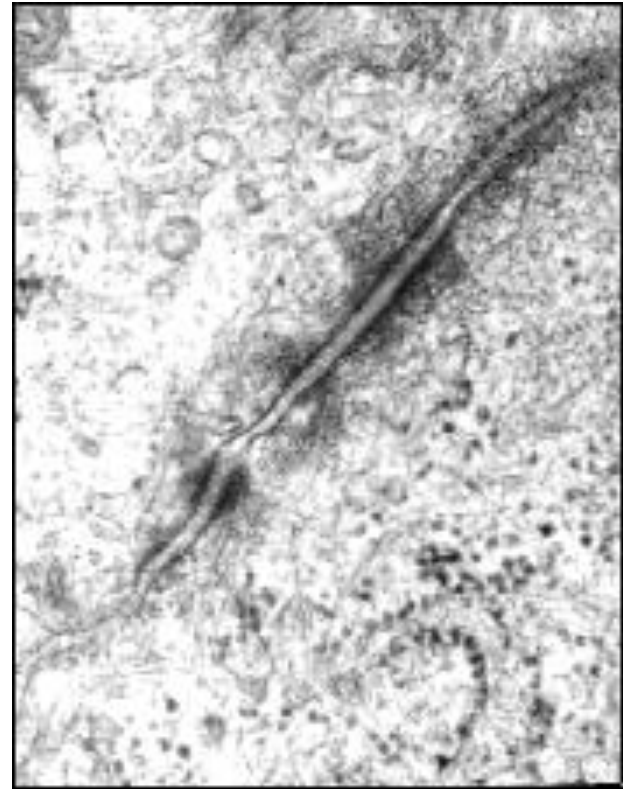
Le selectine possiedono un dominio capace di legarsi ai carboidrati e giocano un ruolo nella risposta infiammatoria perchè in genere si legano agli zuccheri presenti sulla superficie dei neutrofili.

Importante per lo sviluppo
aggregazione e disaggregazione
cellulare (up and down regulation).

Anticorpi contro cadherina rompono i
legami e distruggono epitelio

Sono Ca dipendenti

E cad (epiteliale), N cad, ecc



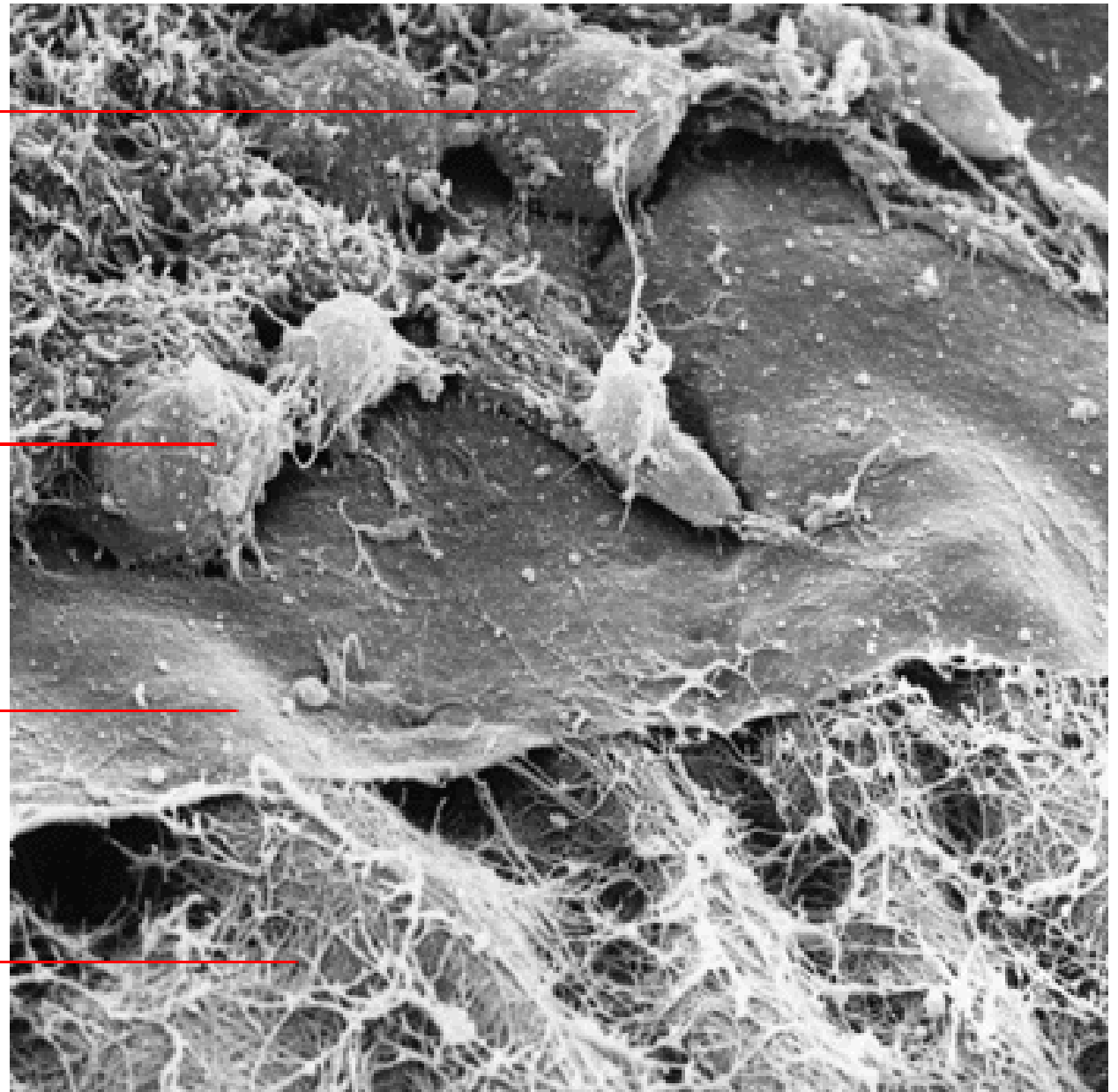
I IgCAM (LCAM e NCAM) invece non sono Ca^{++}
dipendenti, meno forti delle caderine, e possono cambiare
la forza del legame riducendo la lunghezza della catena
extra citoplasmica

Epithelial cells

Epithelial cells

Basal lamina

Collagen fibrils



10 μm

Scanning electron micrograph of a basal lamina in the cornea of a chick embryo

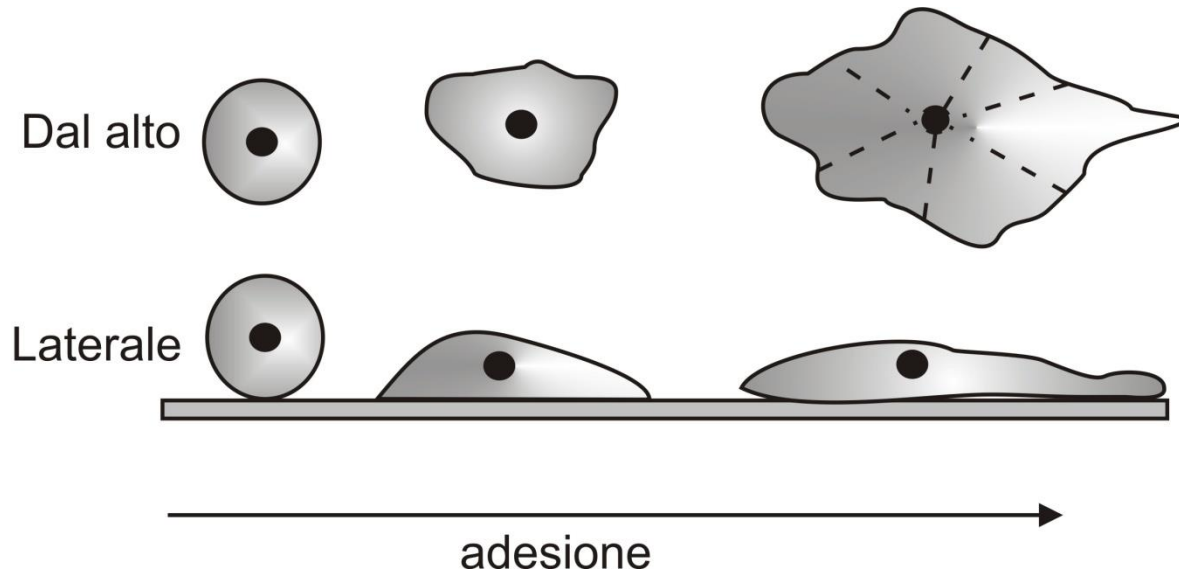
Stimare il numero di integrine che una cellula endoteliale deve possedere per superare le forze di taglio imposte dal flusso sanguigno in un'arteria.

Diametro cellula = $20 \mu\text{m}$, altezza trascurabile

Velocità media del sangue nell'arteria di diametro 1.5 cm = 40 cm/s

Viscosità del sangue = 0.004 Pas

Uno dei problemi associato all'utilizzo di scaffold sintetici per l'ingegnerizzazione dei vasi è la mancanza di un'adeguata adesione di cellule endoteliali sulla parete luminale, che causa la formazione di trombi e altre complicazioni. Uno degli approcci considerati è l'immobilizzazione di ligandi di adesione, tipicamente in forma di sequenze amminoacidi contenenti RGD. Dato che un'integrina si lega a un RGD, calcolare la densità superficiale ($\#/\mu\text{m}^2$) di RGD necessario per assicurare un'adeguata adesione e quindi la distanza tra un ligando e l'altro. Discutere alcuni dei problemi che si possa incontrare con l'utilizzo di questo approccio. I dati sono da confrontare con le densità superficiali di $600\text{--}700 \text{ ligandi}/\mu\text{m}^2$ necessarie per formare adesioni focali riportate in Cavalcanti-Adam et al (Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands, Biophysical Journal, Volume 92, 2007 p. 2964–2974).



Cellula non adesa, poco adesa e molto adesa, su un substrato.

IL controllo dell'adesione (e quindi motilità, e espressione quindi fenotipo)

Gradienti chemotattici: concentrazioni differenti nello spazio, nel caso di ligandi solubili, possono dare luogo alla migrazione.

Gradienti haptotattici: concentrazioni differenti nello spazio nel caso in cui il ligando sia insolubile o immobilizzato. Si tratta per esempio di molecole presenti su un substrato o le molecole del ECM

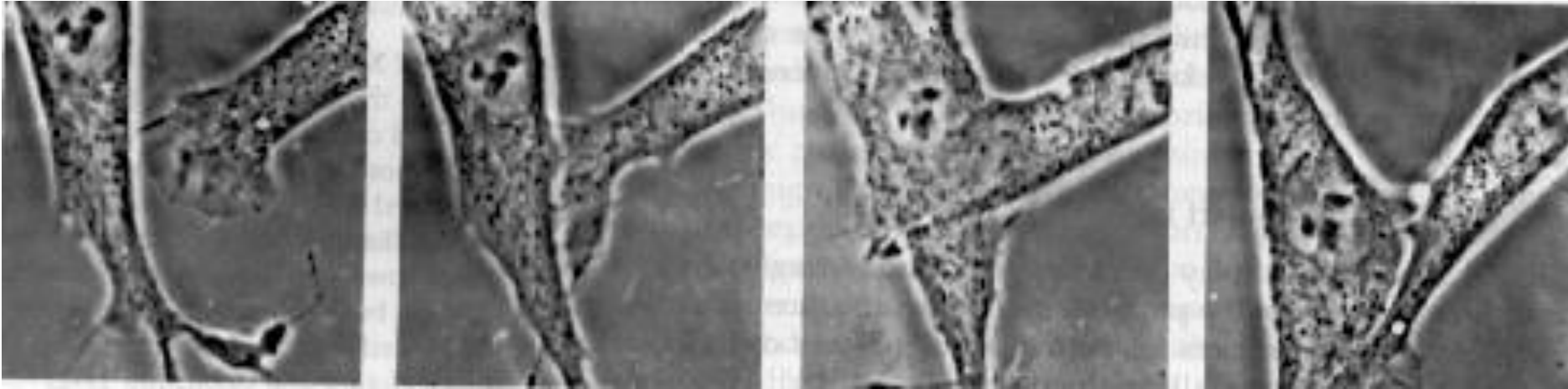
Inibizione da contatto: Quando le cellule sentono la vicinanza fisica delle altre, non sono più in grado di spostarsi o proliferare. Il contatto può essere considerato come un segnale che l'unità funzionale è arrivata a uno stato di equilibrio. L'inibizione da contatto è un meccanismo molto importante nelle cellule epiteliali, ed è noto che le cellule tumorali perdono questo tipo di controllo interno, dando luogo alla formazione di masse cellulari o tumori.

Galvanotassi: E' il movimento cellulare dovuto alla presenza di campi elettrici, ed è un fenomeno ben noto negli embrioni che possiedono anche una polarità elettrica.

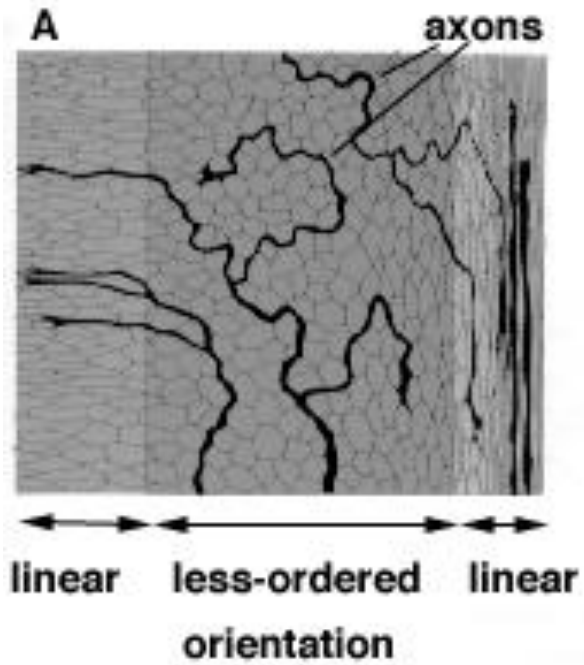
Guida dal contatto o "contact guidance": La modulazione del movimento e crescita in base alla forma topologica del substrato. E' un fenomeno noto soprattutto nelle colture cellulari di neuroni e nella coltura di cellule muscolari scheletriche.

Durotassi: fenomeno noto da poco. Regolazione adesione in base al modulo elastico del substrato.

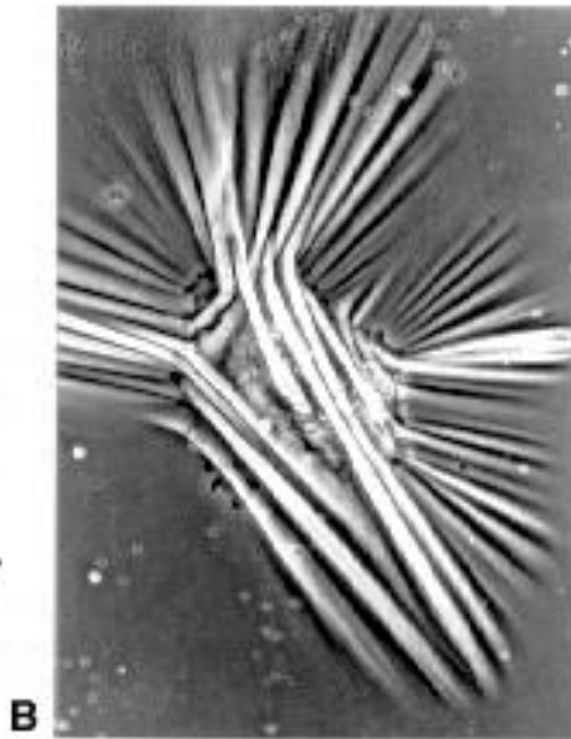
Inibizione di contatto invece da un segnale a una cellula di non muovere o crescere piu, e i risultato e un movimento da masse di cellule. I lamelli crescono verso zone dove non ci sono cellule. Il fenomeno occorre principalmente in c. Mesenchimali e non occorre in strati epiteliali (solo tumorali) tranne ai bordi laterali.



Fibroblasti: i lamellipodii si avvicinano, poi una passa sotto e dopo si ritira

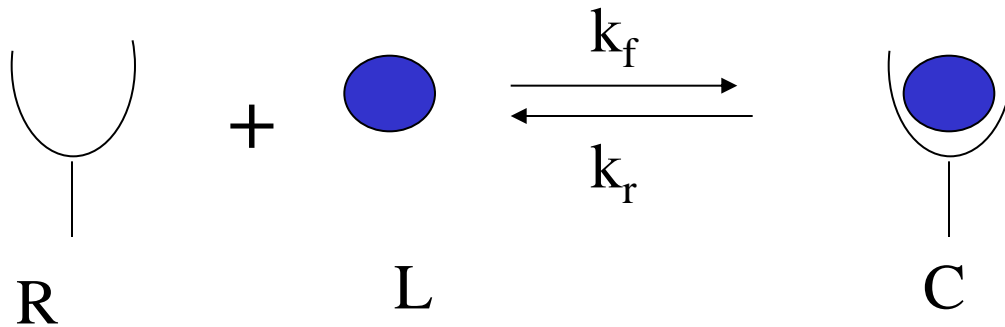


Assono su reti



Le linee di stress create da un fibroblasto su silicone

Questo è contact guidance



We consider a model of receptor-ligand binding in which binding is monovalent and interfering effects are absent. k_f and k_r are the kinetic association and dissociation constants.

R =number of receptors per cell

C =number of complexes per cell

L =conc of ligand in the ECM (moles/liter)

$k_r = t^{-1}$

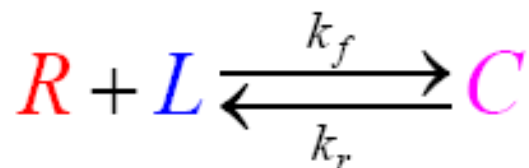
$k_f = M^{-1}t^{-1}$

N =number of cells per unit volume

ok

Monovalent Binding

- For the receptor-ligand reaction:



- We can write a simple **Master Equation** that states that the rate of accumulation of bound complex C is equal to the rate at which molecules associate to form C less the rate at which C dissociates into its components:

$$\frac{dC}{dt} = k_f RL - k_r C$$

- Here
 - C is the concentration of product,
 - R is the concentration of receptor
 - L the concentration of ligand.
- The units for all of these is mol/L or M. k_f is the forward reaction rate ($M^{-1}s^{-1}$) and k_r is the reverse reaction rate [s^{-1}]

Monovalent Binding Master Equation

- One can go further by applying “conservation laws”:

$$R_T = R + C \quad \text{and} \quad L_o = L + C$$

- where R_T = total number of receptors and L_o = initial ligand concentration. We thus obtain:

$$\frac{dC}{dt} = k_f (R_T - C)(L_o - C) - k_r C$$

- To simplify this, suppose that L_o is very much larger than C and thus ligand isn't depleted much by the reaction from its initial value, L_o . We then get:

$$\frac{dC}{dt} = k_f (R_T - C)L_o - k_r C$$

- As one may check that with the initial condition $C(t=0) = C_o$, the solution to this equation is:

$$C(t) = C_o \exp\left[-(k_f L_o + k_r)t\right] + \left(\frac{k_f L_o R_T}{k_f L_o + k_r}\right) \left\{1 - \exp\left[-(k_f L_o + k_r)t\right]\right\}$$

- As $t \rightarrow \infty$, (i.e. at equilibrium):

$$C_{eq} = \left(\frac{k_f L_o R_T}{k_f L_o + k_r}\right)$$

Dividing by k_f we get

$$C_{eq} = \frac{L_o R_T}{L_o + \frac{k_r}{k_f}} = \frac{L_o R_T}{L_o + k_D}$$

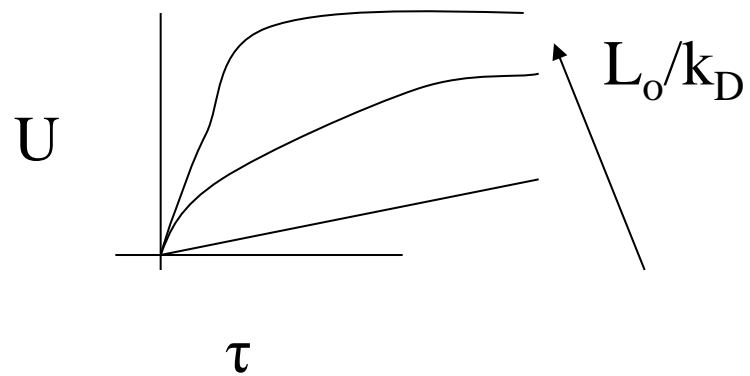
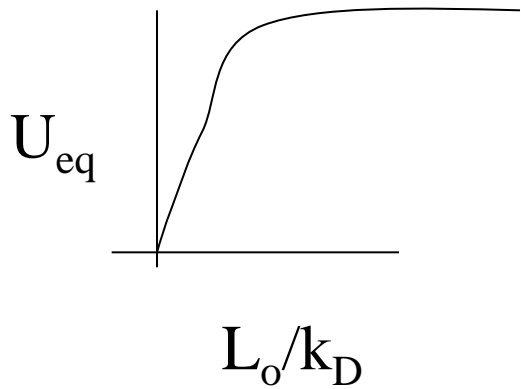
Where we define $\frac{k_r}{k_f} = k_D$ as the equilibrium dissociation constant.

The equations are more simply expressed in terms of adimensional parameters, U (ratio of complexes to total number of sites) and τ (a characteristic reaction time).

$$U(\tau) = U_o \exp\left(-\left\{1 + \frac{L_o}{k_D}\right\}\tau\right) + \frac{\frac{L_o}{k_D}}{1 + \frac{L_o}{k_D}} \left(1 - \exp\left(-\left\{1 + \frac{L_o}{k_D}\right\}\tau\right)\right)$$

$$U_{eq} = \frac{\frac{L_o}{k_D}}{1 + \frac{L_o}{k_D}}$$

$$U_{eq} = \frac{L_o/k_D}{1 + L_o/k_D}$$



8). Considerare una coltura di condrociti seminati su scaffold porosi in microwells da 1.5 ml, con $1 \cdot 10^6$ cellule/scaffold. I condrociti esprimono circa 10^5 recettori per TGF- β , un fattore di crescita. A che concentrazione di TGF- β si ha il fenomeno di ligand depletion? K_D per il legame TGF- β - recettore per TGF- β e' 10^{-10} Molare.

6) La molecola di dexametasone (DEX) aumenta la produzione di collagene in osteoblasti, grazie all'interazione di DEX con un recettore. Per controllare la produzione di collagene in vivo e in vitro, si può utilizzare un farmaco che inibisce l'azione del DEX in maniera competitiva. La massima velocità di produzione di collagene è 100 molecole/cellula/s. In un tipico esperimento si aggiunge una concentrazione di $1 \cdot 10^{-8}$ M di DEX che dà luogo a una produzione del 75%.

a) Calcolare il K_D (costante di equilibrio) del DEX.,

b) si aggiunge poi il farmaco che inibisce la produzione di collagene. A $5 \cdot 10^{-7}$ M di farmaco, la produzione diminuisce a 65%. Calcolare il K_D per il farmaco inibitore..

c) Che concentrazione di DEX ci vuole per resituire la produzione di collagene in presenza di $5 \cdot 10^{-7}$ M del farmaco ?

d) quali assunzioni si fa per ottenere le soluzioni a a,b, e c?.